

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Role onkogenu erbB-2 v biologii rakovinných kmenových buněk

The role of erbB-2 oncogene in the biology of cancer stem-like cells

KATEŘINA PROKOPOVÁ

ŠKOLITEL: PROF. JIŘÍ NEUŽIL, CSc.

PRAHA 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, za použití uvedené literatury.

V Praze dne 31.8.2010

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. Jiřímu Neužilovi za podnětné vedení této práce i za uvedení do světa vědy jako takové.

Zvláštní dík patří Jaroslavu Truksovi, PhD za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků a Mgr. Renatě Zobalové za spolupráci při zavádění kultury mammosfér. V neposlední řadě děkuji i všem kolegům z Laboratoře molekulární terapie za cenné rady a pomoc při experimentální práci a za přátelské prostředí, které v rámci laboratoře vytvářejí.

Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt	6
<i>Klíčová slova</i>	<i>6</i>
Abstract.....	7
<i>Keywords</i>	<i>7</i>
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	10
2. Literární přehled	12
2. 1. Teorie rakovinných kmenových buněk.....	12
2. 2. Charakteristika rakovinných kmenových buněk	14
2. 3. Nádorové mikroprostředí.....	20
2. 4. Mammosféry, in vitro model rakovinných kmenových buněk	21
2. 5. ErbB-2 onkogen a jeho role v rakovinných kmenových buňkách	24
2. 5. 1. Signalizace EGF receptory	24
2. 5. 2. Amplifikace erbB-2 a proces transformace	27
2. 5. 3. Dráhy deregulované v kontextu erbB-2 signalizace	28
2. 6. Léčebné strategie	30
2. 7. Onkogen ErbB-2 a rakovinné kmenové buňky.....	31
3. Cíle diplomové práce.....	33
3. 1. Rakovinné kmenové buňky (RKB).....	33
3. 2. Role onkogenu <i>ErbB2</i> v procesu utváření a udržování mammosférového fenotypu .	33
3. 3. Schopnost buněk vytvářet nádory v imunodeficientních myších.....	33
4. Materiál a metody	34
4. 1. Kultivace buněk	34
4. 2. Příprava stabilních linií.....	35

4. 3.	<i>Izolace RNA</i>	37
4. 4.	<i>Kvantitativní Real-Time PCR (qPCR)</i>	37
4. 5.	<i>Průtoková cytometrie</i>	39
4. 6.	<i>Experimentální myší model</i>	39
4. 7.	<i>Ultrazvukové zobrazování</i>	40
4. 8.	<i>Statistická analýza</i>	40
5.	Výsledky	41
5. 1.	<i>Kultivace rakovinných kmenových buněk rakoviny prsu</i>	41
5. 2.	<i>Charakterizace genové exprese v průběhu utváření RKB</i>	43
5. 3.	<i>Role onkogenu <i>erbB-2</i> v RKB</i>	49
5. 4.	<i>Schopnost buněk vytvářet nádory v nahé BALB/c nu-nu myši</i>	59
6.	Diskuze	60
6. 1.	<i>Kultivace mammosfér</i>	60
6. 2.	<i>Charakterizace genové exprese v průběhu utváření mammosfér</i>	61
6. 3.	<i>Role onkogenu <i>erbB-2</i> v RKB</i>	64
6. 4.	<i>Xenotransplantace</i>	68
7.	Závěr a perspektivy	70
8.	Použitá literatura	73

Abstrakt

Nedávné výzkumy ukazují na přítomnost minoritní frakce nádorových buněk, která vykazuje určité “kmenové“ vlastnosti. Tyto tzv. rakovinné kmenové buňky (RKB) se vyznačují relativně vyšší odolností k léčbě, tradičně zaměřené na diferencované a rychle se dělicí buňky a proto mohou být příčinou relapsů nádorových onemocnění. RKB sdílejí specifickou expresi genů a deregulaci signálních drah. Jednou ze známých deregulací je zvýšená exprese receptoru erbB-2 (HER2), vyskytující se u ~25-30% případů rakoviny prsu. Zvýšená exprese erbB-2 receptoru je spojena se špatnou prognózou, zvýšeným proliferačním potenciálem a s rezistencí vůči chemoterapii. Dle nedávných výzkumů se při zvýšení hladiny erbB-2 zvyšuje i procento RKB v populaci nádorových buněk. V této diplomové práci jsme jako model RKB rakoviny prsu *in vitro* studovali tzv. mammosféry, rostoucí v médiu bez obsahu séra, do něhož jsou buňky postupně převáděny. Tyto buňky jsou CD44⁺, vyznačují se zvýšenou expresí ABCG-2, Sox-2, Vimentinu a také vysokými hladinami erbB-2. Dále jsme připravili stabilní linii MCF7 buněk se sníženou hladinou erbB-2 pomocí shRNA plazmidu. V erbB-2⁻ buňkách jsme charakterizovali expresi sady markerů RKB a sledovali schopnost těchto buněk iniciovat tvorbu nádoru v nahé myši pomocí ultrazvuku.

Klíčová slova

Rakovinné kmenové buňky, erbB-2, rakovina prsu, mammosféry

Abstract

Recent studies indicate the existence of a subpopulation of cells within tumours with stem cell-like characteristics. These “cancer stem-like cells” (CSCs) are relatively resistant to established therapies, usually targeting differentiated and fast proliferating cells. Therefore, CSCs may be a reason for the relapse of neoplastic diseases. CSCs can be characterised by a specific gene expression profile and deregulated signalling pathways. Of these, upregulation of the erbB-2 (HER2) receptor, a hallmark of ~25-30% breast cancer patients, is related to dismal prognosis, elevated proliferation potential and resistance to chemotherapy. Recent evidence has suggested that upregulation of erbB-2 leads to increase in the pool of CSCs. In our study we used mammospheres, cells grown in the absence of serum, an *in vitro* model of breast CSCs, which were prepared by “weaning” breast cancer MCF7 cells to a special medium. These cells were CD44^{high} and showed increased expression of ABCG-2, Sox-2, Vimentin as well as high levels of erbB-2. Next, we prepared a stable line of MCF7 cells with low levels of erbB-2 by shRNA. ErbB-2^{low} cells were characterised for expression of set of CSCs markers and tested for tumour forming efficacy in nude mice using ultrasound imaging.

Keywords

Cancer stem-like cells, erbB-2, breast cancer, mammospheres

Seznam zkratek

ABC transportéry	"ATP-binding cassette transporters"
ABCG-2	"ATP-binding cassette superfamily G member 2"
AP-2	Aktivační protein 2
CAF	"carcinoma associated fibroblast"
CCL5	Chemokin (C-C motiv) ligand 5
CSC	"cancer stem-like cells"
CSF-1	"colony-stimulating factor 1"
CXCR4	Chemokine (C-X-C motiv) receptor 4
EMT	Epitelo-mezenchymální transice
ErbB-2	viz v-erb-b2
ESA	"epithelial specific antigen"
FGF	"Fibroblast growth factor"
FOXP3	"forkhead box P3"
GAPDH	Glyceraldehyd- 3-fosfát dehydrogenáza
IVC	Individuálně ventilovaný klecový systém
LB	"Luria broth"
MMTV	"mouse mammary tumour virus"
NOD/SCID	"non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency"
OAZ-1	"Ornithine decarboxylase antizyme 1"
Oct-4	viz POU5F1
PE	R-phycoerytrin
PEA3	"ETS-domain transcription factor pea3"

POU5F1	"POU class 5 homeobox 1"
PTEN	"phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10"
RANTES	viz CCL5
RKB	rakovinné kmenové buňky
SDF-1	"stromal cell-derived factor 1"
SIRP α	"signal-regulatory protein α "
Sox-2	viz SRY
SP	"side-population"
SRY	"(sex determining region Y)-box 2"
TAM	"tumour associated-macrophage"
V-erb-b2	"erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2"

1. Úvod

Rakovina zůstává i přes značné pokroky v terapii nádorových onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí v zemích vyspělého světa. V rámci nádorových onemocnění tvoří rakovina prsu téměř 30% nových případů rakoviny u žen a po rakovině plic je druhou nejčastější příčinou úmrtí (Jemal et al, 2010). Jednou z možností jak vysvětlit časté relapsy onkologických onemocnění a jejich rezistenci k léčbě je hypotéza o přítomnosti frakce tzv. nádorových kmenových buněk (rakovinné kmenové buňky, RKB). Tyto buňky představují subpopulaci nádoru, která na rozdíl od normálních nádorových buněk, má schopnost iniciovat růst a zároveň se sebeobnovovat (Reya et al, 2001). Vzhledem k vyšší odolnosti k tradiční chemoterapeutické léčbě mohou RKB přežít terapii a později iniciovat vznik sekundárních nádorů (Li et al, 2008). I přesto, že v otázce existence a významu RKB v současné době nepanuje obecný konsenzus, neustále přibývá studií, které ukazují na esenciální roli populace RKB v procesu dlouhodobé eradikace některých typů nádorů (Al-Hajj et al, 2003; Li et al, 2007; Ricci-Vitiani et al, 2007). Zásadní úloha buněk s vyšším stupněm “kmenovosti” se podle nedávných výzkumů předpokládá i v případě rakoviny prsu, která je modelem pro tuto práci (Al-Hajj et al, 2003; Korkaya et al, 2008). Více než čtvrtina všech nádorů prsu se vyznačuje zvýšenou expresí nebo amplifikací genu pro receptor epidermálního růstového faktoru 2 (erbB-2/Her2). Amplifikace tohoto onkogenu je spojována s horší prognózou onemocnění a se zvýšenou schopností vyvářet metastázy (Slamon et al, 1989). Zvýšená exprese erbB-2 dále vede k nárůstu populace RKB (Korkaya et al, 2008). Je tedy možné, že se erbB-2 účastní na regulaci “kmenovosti” těchto buněk. Tato oblast je v současné době silně diskutována, mimo jiné i z důvodu rezistence velkého procenta pacientů k současné léčbě nádorů prsu zaměřené na erbB-2.

V této práci se zaměříme na studium vlastností populace rakovinných kmenových buněk rakoviny prsu a pokusíme se navázat na studie zabývající se rolí onkogenu erbB-2 v rakovině prsu.

Cílem této práce je kultivovat rakovinné kmenové buňky MCF7 linie lidské rakoviny prsu v podobě mammosfér ve speciálním bezsérovém médiu. Ve vzniklých mammosférách charakterizovat expresi genů spojených s kmenovostí, používaných

jako markery RKB v publikacích a tak ověřit, že model odpovídá RKB, tedy buňkám s vyšší hladinou “kmenovosti“ a schopností sebeobnovování a diferenciací.

Další linií pokusů je studium role onkogenu erbB-2 v rakovinných kmenových buňkách. Pro řešení těchto cílů bude třeba vytvořit linii MCF7 buněk se sníženou hladinou exprese erbB-2 onkogenu a následně charakterizovat expresi markerů “kmenovosti“ v porovnání s buňkami s normální hladinou erbB-2. Dále bude třeba ověřit, zda tyto buňky tvoří mammosféry.

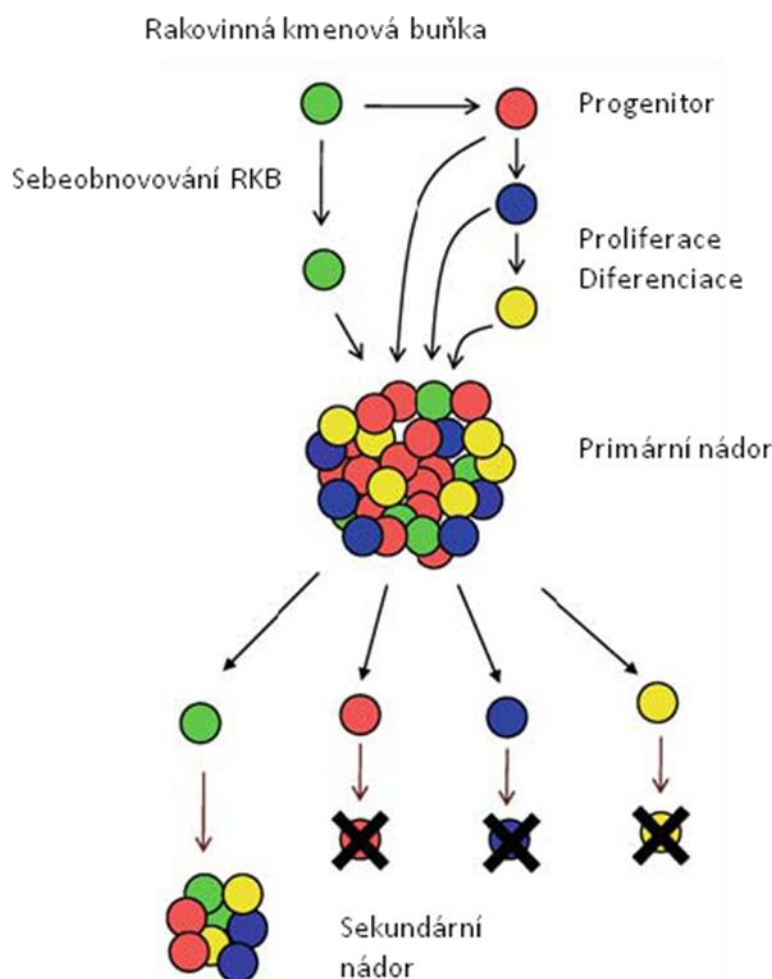
V neposlední řadě je cílem této práce otestovat schopnost buněk iniciovat tvorbu nádorů v imunodeficientní myši v závislosti na hladině exprese onkogenu erbB-2.

2. Literární přehled

2. 1. Teorie rakovinných kmenových buněk

V současné době existují dvě hlavní teorie vysvětlující vznik nádorů – jde o tzv. stochastický model karcinogeneze, který předpokládá, že všechny buňky nádoru jsou schopné iniciovat sekundární nádory a tzv. hierarchický model, předpokládající přítomnost minoritní frakce buněk s vyšší “kmenovostí“, zodpovědné za iniciaci nádorového bujení. Pro podobnost s normálními kmenovými buňkami v orgánech byly tyto buňky nazvány rakovinné kmenové buňky (RKB), popř. nádor iniciující buňky (Reya et al, 2001). RKB mají schopnost symetrického i asymetrického dělení a mohou tedy produkovat jak sesterské RKB, tak i heterogenní více diferencované rakovinné buňky. Rakovinné buňky bez kmenových vlastností tvoří z tohoto pohledu tzv. nádorovou masu, jež na rozdíl od RKB frakce nemá schopnost iniciovat vznik nádoru (Obr. 1). Na rychle proliferující buňky nádorové masy je však zaměřena tradiční onkologická léčba, rezistentní RKB tedy mohou léčbu překonat a stát se příčinou relapsů u zdánlivě vyléčených pacientů (Bao et al, 2006; Li et al, 2008; Woodward et al, 2007).

Z konceptu RKB plyne, že pro úspěšné vyléčení mnoha typů rakovin bude nezbytné zacílit léčbu nejen na rychle rostoucí, více diferencované buňky nádorové masy, ale zvláště se zaměřit na zničení populace RKB.



Obr. 1 Vznik nádoru z RKB.

RKB má na rozdíl od více diferencovaných buněk nádorové masy schopnost produkovat dceřiné buňky různých fenotypů a také se sebeobnovovat. V nádoru, na počátku vzniklém z jedné nebo několika buněk, se postupně diferencuje mnoho heterogenních klonů. Schopnost iniciovat vznik sekundárních nádorů má však pouze RKB. Upraveno dle Kai et al (2010).

Přesto, že první úvahy o možném spojení rakovinných procesů a “kmenových” buněk jsou staré již více než 150 let (Sell, 2004), není původ RKB dodnes spolehlivě vysvětlen. RKB mohou vznikat z normálních kmenových buněk mutací protoonkogenů (Bonnet and Dick, 1997; Shimono et al, 2009), ale pravděpodobně tomu tak není u všech typů nádorů. I diferencovaná buňka může mutací získat schopnost sebeobnovování a stát se RKB. RKB mohou vznikat z populace rakovinných buněk, v rámci procesu tzv. imunoeditace, kdy je vznikající nádor vystavován tlaku imunitního systému hostitele. Termín “rakovinné kmenové buňky“

tedy nevypovídá o původu buňky z buňky kmenové, ale spíše o jejích “kmenových” vlastnostech (Clarke et al, 2006).

Rakovinné kmenové buňky byly poprvé identifikovány a purifikovány u akutní myeloidní leukémie (AML) v roce 1997 (Bonnet and Dick). Leukemické buňky charakterizované povrchovými markery $CD34^{+}CD38^{-}$ tvořily minoritní subpopulaci nádoru, která vykazovala schopnost přenášet AML do experimentální imunosuprimované myši. V následujících letech byly minoritní subpopulace nádorových buněk s “kmenovými” vlastnostmi identifikovány i v pevných nádorech (Al-Hajj et al, 2003; Collins et al, 2005; Li et al, 2007; Ricci-Vitiani et al, 2007; Singh et al, 2004). Tyto studie podpořily teorii, že schopnost vyvolat nový nádor má v rámci populace rakovinných buněk pouze malá, fenotypově odlišná subpopulace, označovaná termínem rakovinné kmenové buňky (Hamburger and Salmon, 1977).

2. 2. Charakteristika rakovinných kmenových buněk

Rakovinné kmenové buňky se vyznačují specifickými povrchovými markery a deregulací signálních drah. To je odlišuje nejen od buněk nádorové masy, ale zároveň se zdá, že RKB vykazují i vlastnosti, kterými je bude možné odlišit od normálních kmenových buněk. RKB jsou často v G_0 fázi buněčného cyklu a tedy méně citlivé na chemoterapeutika cílená na proliferující buňky (Al-Hajj et al, 2003). Mají aktivnější aparát pro opravu DNA, což vede ke zvýšené rezistenci k radioterapii (Bao et al, 2006). RKB dále vykazují zvýšené hladiny exprese anti-apoptotických proteinů FLIP, Bcl-2, Bcl-x_L, inhibitorů apoptózy z rodiny IAP a naopak snížené hladiny pro-apoptotických proteinů (Liu et al, 2006; Stefano et al, 2010). Typická je pro RKB i zvýšená exprese genů pro ABC transportéry, zajišťující těmto buňkám vyšší odolnost vůči chemoterapeutikům (Lou and Dean, 2007).

RKB populace v jednotlivých typech nádorů je charakterizována kombinací povrchových markerů. RKB rakoviny prsu byly charakterizovány jako $CD44^{+}ESA^{+}CD24^{-/low}$ populace (Al-Hajj et al, 2003). Již sto buněk tohoto fenotypu mělo schopnost vytvořit nádor v NOD/SCID myši, zatímco nesortované buněčné populace vytvořily nádor až po podání 10-50 krát většího množství buněk. Pro

rakovinu tlustého střeva byla RKB frakce charakterizována jako pozitivní na povrchový marker CD133 (Ricci-Vitiani et al, 2007). Marker CD133 je zároveň používán pro identifikaci RKB při rakovině prostaty a v nádorech mozku (Collins et al, 2005; Singh et al, 2004). Příklady povrchových markerů charakteristických pro jednotlivé populace RKB jsou uvedeny v Tabulce 1.

V současné době nicméně není znám žádný konkrétní marker charakterizující různé typy RKB, proto jsou využívány kombinace několika povrchových markerů doplněné funkčními studiemi. Za esenciální znak RKB je považována schopnost iniciace nádorového bujení v experimentálních imunosuprimovaných myších a přenos vzniklých nádorů na další jedince (Clarke et al, 2006; Tang et al, 2007).

Akutní myeloidní leukémie	CD34 ⁺ CD38 ⁻ (Bonnet and Dick, 1997)
Rakovina mozku	CD133 ⁺ nestin ⁺ (Singh et al, 2004)
Rakovina pankreatu	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ (Li et al, 2007)
Rakovina prostaty	CD44 ⁺ $\alpha\beta 1^{hi}$ CD133 ⁺ (Collins et al, 2005)
Rakovina prsu	CD44 ⁺ ESA ⁺ CD24 ^{-/low} Lin ⁻ (Al-Hajj et al, 2003)
Rakovina tlustého střeva	CD133 ⁺ CD44 ⁺ (Dalerba et al, 2007; Ricci-Vitiani et al, 2007)

Tabulka 1. *Přehled markerů populace rakovinných kmenových buněk u vybraných druhů nádorů.*

CD44 je transmembránový glykoprotein jehož exprese je spojována s rezistencí k terapii a s horší prognózou mnoha nádorových onemocnění (Ahrens et al, 2001; Li et al, 2007). Uplatňuje se v mezibuněčných kontaktech a kontaktech buňky a extracelulární matrix. Protein je exprimován ve velkém množství variant vzniklých

post-translačními modifikacemi (glykosylace, glykosaminoglykanace) a alternativním sestřihem primárního transkriptu silně evolučně konzervovaného genu (Naor et al, 1997). Sestřihové varianty proteinu CD44 jsou specifické pro určitý typ rakovinných buněk a mohly by být využity jako diagnostické markery. Hlavním ligandem CD44 je kyselina hyaluronová, protein však interaguje i s mnoha dalšími ligandy: kolagen, fibronectin, laminin, chondroitinsulfát a další (Naor et al, 2008). Intracelulární doména proteinu CD44 interaguje s kinázami, např. erbB-2, PKC TGF- β , c-src (Bourguignon et al, 2001; Bourguignon et al, 2002). Vzhledem k interakcím s těmito signálními drahami mají CD44⁺ buňky aktivované anti-apoptotické dráhy, zvýšený metastatický potenciál, a účastní se chemotaxe a angiogeneze. Zvýšená exprese CD44 je charakteristickým markerem pro RKB populaci rakoviny prsu (Al-Hajj et al, 2003), prostaty (Collins et al, 2005), pankreatu (Li et al, 2007) a tlustého střeva (Dalerba et al, 2007).

CD24 je malý silně glykosylovaný povrchový protein vázaný k membráně přes glykosylfosfatidylinositolovou kotvu. Protein se účastní vývoje B-buněk a neurogeneze a je exprimován v mnoha lidských nádorech: rakovina prsu (Kristiansen et al, 2003), rakovina prostaty (Collins et al, 2005), hepatocelulární karcinom (Huang and Hsu, 1995), karcinom pankreatu (Li et al, 2007) atd. V nádorech pravděpodobně zvyšuje metastatický potenciál, mobilitu a invazivitu buněk. CD24 je vazebnou molekulou pro P-selektin, adhezní receptor exprimovaný na aktivovaných endoteliálních buňkách a krevních destičkách. Exprese CD24 na nádorových buňkách uvolněných do krevního oběhu umožňuje navázání na P-selektin, fibronectin a další složky extracelulární matrix. Postupně se tak vytváří shluk rakovinných buněk, přičemž CD24 zprostředkuje valivý pohyb buněk po endotelu a jejich následné proniknutí do subendoteliálního prostředí (Aigner et al, 1998). Podle Baumannové et al (2005) je CD24 dostačujícím nástrojem tvorbu metastáz *in vivo*. Bylo zjištěno, že vysoký počet CD24⁺ buněk se nachází zvláště ve vzdálených metastázách (Shipitsin et al, 2007). RKB populace rakoviny prsu je podle Al-Hajje et al (2003) a dalších definována jako CD24⁻, zatímco CD24⁺ buňky jsou považovány za součást nádorové masy. Zdá se však, že funkce tohoto markeru je komplexnější než se předpokládalo: zatímco CD24⁻ buňky mohou být vysoce potentní v iniciaci tvorby nádoru, invazivitu a schopnost vytvářet metastázy získá nádor až po vystavení CD24 na povrch buněk. Pece et al (2010) v nedávné době ukázali, že schopnost

vytvářet mammosféry z normálních kmenových buněk prsní žlázy mají pouze CD24⁺ buňky (nikoliv CD24^{medium/low} populace), přičemž agresivní málo diferencované nádory prsu vykazovaly vyšší hladiny exprese CD24 než diferencované méně agresivní nádory. Autoři dále ukazují, že zatímco u normálních buněk mléčné žlázy je CD24 exprimováno na plazmatické membráně, u nádorových buněk se tento protein nachází zvláště v cytoplazmě (Kristiansen et al, 2003; Pece et al, 2010). Zároveň se hladina exprese CD24 liší podle druhu nádoru, jak bylo ukázáno u rakoviny prsu: CD44⁺CD24⁻ fenotyp se vyskytuje zvláště u bazálních nádorů a částečně v dědičných BRCA-1 nádorech, naopak v HER2⁺ nádorech se tento fenotyp vyskytuje velmi zřídka a je možné, že pro tento případ bude třeba vyžít jiných markerů populace RKB (Honeth et al, 2008).

CD133 (Prominin-1, AC133) je povrchový glykoprotein složený z pěti transmembránových úseků a dvou extracelulárních glykosylovaných smyček. Protein je lokalizován v oblasti lipidových raftů na výběžcích plazmatické membrány. Funkce CD133 není dodnes zcela jasná, ale vzhledem k lokalizaci se předpokládá jeho účast v mezibuněčných kontaktech. CD133 byl poprvé popsán jako povrchový marker hematopoetických kmenových buněk (Yin et al, 1997), později byl nalezen i u kmenových buněk dalších linií, např. endotelu (Peichev et al, 2000) a embryonálního epitelu (Corbeil et al, 2000). CD133 existuje ve dvou sestříhových variantách, a to kompletní AC133-1 a AC133-2 s vystřiženým exonem 4. Obě varianty jsou lokalizované na plazmatické membráně, ale jsou různě exprimovány v různých buněčných liniích. AC133-1 se vyskytuje zvláště v mozku a kosterní svalovině zárodku. AC133-2 převládá v nikách kmenových buněk a v hematopoetické tkáni. Expres AC133-2 se snižuje při diferenciaci buněk (Yu et al, 2002). Expres CD133 je zvýšená v subpopulacích RKB některých typů rakovin: např. rakoviny prostaty (Collins et al, 2005), tlustého střeva (Ricci-Vitiani et al, 2007), u nádorů mozku (Singh et al, 2004). Populace CD133⁺ buněk byla objevena i u rakoviny prsu (Wright et al, 2008). CD133⁺ buňky v těchto studiích vykazovaly schopnost vytvořit nádor po přenosu do NOS/SCID myši, na rozdíl od CD133⁻ populace, která vykazovala mnohem menší míru tumorigenicity. Expres CD133 v rakovinných buňkách ovlivňuje buněčnou polaritu, mezibuněčné interakce a migraci (Elsaba et al, 2010; Shmelkov et al, 2005), a vede k vyšší odolnosti vůči apoptóze (Zobalova et al, 2008). Roli tohoto proteinu jako markeru RKB však zpochybnil Shmelkov et al (2008) když

za pomoci knock-in myšího modelu s vloženým *lacZ* reportérovým genem (CD133^{lacZ/+}) zjistil, že v tlustém střevě není exprese CD133 omezená na kmenové buňky. Exprese CD133 byla v této studii zjištěna na diferencovaných buňkách epitelu dospělce. Dále autoři marker CD133 odhalili v nádorových buňkách rakoviny tlustého střeva, ale jak CD133⁺ tak i CD133⁻ buňky byly schopné vytvářet nádory v NOD/SCID myších. Zajímavé bylo zjištění, že metastatické CD133⁻ buňky vytvářely dokonce agresivnější nádory než CD133⁺ a na rozdíl od CD133⁺ buněk exprimovaly markery RKB populace. Takto odlišné výsledky autoři odůvodňují použitím jiné metody detekce CD133, než je běžně používaná imunodetekce za pomoci komerčně dostupných protilátek. Vliv může mít omezená afinita protilátky, odlišná glykosylace nebo případně sestříhová varianta proteinu. Do budoucna bude nutné znovu prověřit expresi CD133 na povrchu rakovinných kmenových buněk. Role markeru RKB je však proteinu CD133 i nadále připisována v mnoha studiích.

Dodnes byla popsána řada dalších markerů RKB, jež mají vztah k tumorigenicitě, kmenovosti, apoptóze a invazivitě. Příkladem může být protein CD47, který je členem imunoglobulinové superrodiny membránových proteinů. Silně glykosylované Ig domény tohoto proteinu zajišťují schopnost interagovat s integriny a jejich ligandy thrombospondiny a dále s proteinem SIRPα (Brown and Frazier, 2001). CD47 je komponentou supramolekulárních komplexů zahrnujících integriny, heterotrimerní G proteiny a cholesterol. Účastní se drah regulujících aktivaci krevních destiček, mobilitu buněk, adhezivitu, migraci a fagocytózu. Důležitá je role proteinu CD47 v regulaci fagocytózy makrofágů. Interakce buňky exprimující CD47 se SIRPα proteinem na makrofázích zprostředkuje jejich mezibuněčnou adhezi (Babic et al, 2000). Vazba SIRPα na CD47 pak vede k negativní regulaci fagocytózy makrofágů. Protein CD47, který je exprimován v malém množství na většině buněčných typů, tedy slouží jako ochrana autologních zdravých buněk před fagocytózou (Oldenburg et al, 2000). Zvýšená exprese CD47 byla nalezena na leukemických buňkách, které přítomnost tohoto markeru chrání před útoky imunitního systému (Jaiswal et al, 2009).

ABCG-2 je členem superrodiny lidských ABC transportérů. Protein je složen z jedné nukleotid-vazebné domény a z membránové domény, a vytváří homodimery a homotetramery (Mao and Unadkat, 2005). ABCG-2 je schopen aktivně přenášet

organické molekuly přes membránu, takže zvýšená exprese tohoto markeru v rakovinných buňkách je spojená s vyšší rezistencí k protirakovinným látkám v mnoha typech rakovin (Honjo et al, 2001; Litman et al, 2000). ABCG-2 je silně exprimován v normálních kmenových buňkách i v RKB a je jedním z důvodů jejich zvýšené rezistence k apoptóze (Nakanishi et al, 2010; Zhou et al, 2001).

V současné době často využívaným markerem pro identifikaci RKB populace je enzym aldehyd dehydrogenáza (ALDH). ALDH se účastní časně diferenciací kmenových buněk (Chute et al, 2006). Aktivita tohoto enzymu měřená pomocí metody ALDEFLUOR (StemCell Technologies) nebo imunohistochemických metod byla úspěšně použita pro identifikaci RKB rakoviny prsu (Ginestier et al, 2007), akutní myeloidní leukémie (Cheung et al, 2007) a nádorů mozku (Corti et al, 2006). Takto značená subpopulace rakovinných buněk se vyznačuje zvýšeným diferenciacním potenciálem a proliferací a má schopnost tvořit metastázy (Charafe-Jauffret et al, 2009). Přítomnost ALDH⁺ populace je považována za znak horší prognózy onemocnění. V porovnání s dříve použitým expresním profilem RKB rakoviny prsu CD44⁺CD24⁻ (Al-Hajj et al, 2003) s ALDH⁺ populací byla zjištěna pouze 1% shoda, nicméně buňky vykazující obě tyto charakteristiky byly silně tumorigenní a již 20 buněk tohoto fenotypu vytvořilo nádor v NOD/SCID myších (Ginestier et al, 2007). Sledování ALDH⁺ populace je tedy slibnou alternativou ke dříve popsaným markerům RKB, nicméně ani v tomto případě zřejmě nepůjde o marker RKB napříč spektrem různých typů neoplastických onemocnění.

Oct-4 (POU5F1) a Sox-2 jsou markery kmenových buněk, které se podílí na udržování jejich kmenového charakteru (Avilion et al, 2003; Martin et al, 2004). Zároveň jsou tyto geny exprimovány v rakovinných buňkách a v některých typech nádorů mohou mít vliv i na udržování RKB populace (Levings et al, 2009; Wang et al, 2010).

Vimentin, hlavní strukturní komponenta středních filament v mnoha typech buněk, se kromě zajišťování mechanické odolnosti buňky podílí na kontraktilitě, migraci a proliferaci buněk. Je silně exprimován ve fibroblastech a endoteliálních buňkách (Wang and Stamenovic, 2002). V kontextu nádorového bujení je důležitá role vimentinu jako markeru epitelu-mezenchymální tranzice (EMT). EMT je proces při

kterém dochází ke změně polarizované nemigrující epiteliální buňky v buňku, která ztrácí polarizaci a získává schopnost migrovat. Zároveň dochází k výměně markerů typických pro epiteliální buňky: E-cadherin, za markery mezenchymálního typu N-cadherin a vimentin (Mandal et al, 2008). Vimentin je považován i za marker nádorového mikroprostředí (Dutsch-Wicherek, 2010).

2. 3. Nádorové mikroprostředí

Podobně jako somatické kmenové buňky, i RKB se nacházejí ve specifických místech v tkáni, tzv. nikách. Nika kmenové buňky je oblast v bezprostředním okolí, která specificky podporuje existenci somatických kmenových buněk a reguluje jejich diferenciaci a proliferaci (Spradling et al, 2001).

Nika nádorů prsu je tvořena mnoha typy buněk, nutných pro udržování nádoru. Obecně mikroprostředí vznikajícího nádoru obsahuje RKB, proliferující rakovinné buňky, nádorové stroma, krevní cévy, infiltrát buněk imunitního systému a další asociované buňky. Toto specifické prostředí je aktivně vytvářeno a regulováno nádorem, který ovlivňuje i okolní tkáň a vytváří efektivní bariéru proti útokům imunitního systému hostitele (Whiteside, 2008). Stromální fibroblasty asociované s karcinomem (CAF) podporují angiogenezi a růst nádoru (Orimo and Weinberg, 2006). Fibroblasty modulují prostředí nádoru sekrecí faktorů jako je TGF- β (Stuelten et al, 2010) nebo SDF-1, který přímo stimuluje růst nádoru a zároveň do místa nádoru rekrutuje prekursor endoteliálních buněk a umožňuje tak neoangiogenezi (Orimo et al, 2005). Huang et al (2010b) ukázali, že kultivace RKB v přítomnosti CAF zvyšuje proliferaci CD44⁺CD24⁻ buněk a po vnesení RKB s CAF do NOD/SCID myši byla v porovnání s mammosférami samotnými silně zvýšena tumorigenicita. Zajímavé je, že v případě vpravení RKB spolu s normálními fibroblasty se prodloužila doba do vytvoření nádoru a obecně se tumorigenicita buněk zhoršila. Další složkou nádorového mikroprostředí jsou makrofágy asociované s nádorem (TAM). TAM jsou do nádoru rekrutovány pomocí různých chemoatraktantů, například CSF-1 (Adams et al, 2006) a podporují růst a invazivitu nádoru. Zásadní roli v nádorovém mikroprostředí zaujímají i mezenchymální kmenové buňky. Tyto buňky sekretují chemokin CCL5 (neboli RANTES), který

zvyšuje mobilitu rakovinných buněk a tím i metastatický potenciál nádoru (Karnoub et al, 2007).

2. 4. Mammosféry, in vitro model rakovinných kmenových buněk

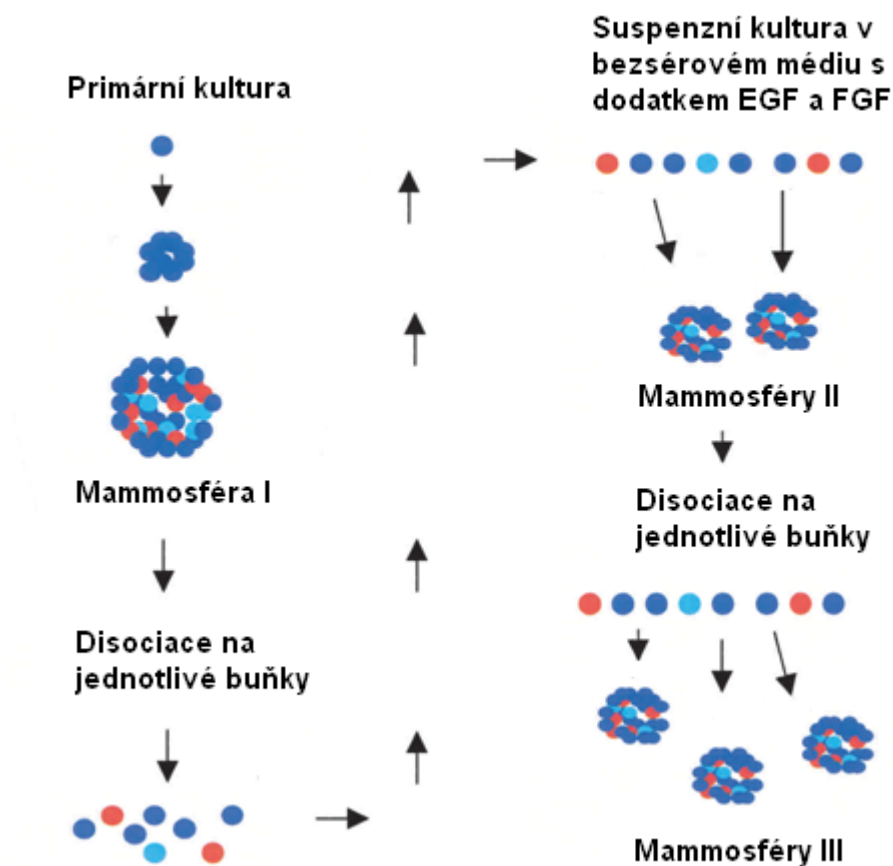
V současné době nejlepším přístupem k identifikaci RKB je *in vivo* důkaz, že zkoumané buňky jsou schopné sériově přenášet nádor po transplantaci do experimentálního zvířecího modelu. Tak jsou prokázány dvě základní vlastnosti RKB, tedy schopnost sebeobnovování a přenášení nádoru. Tento postup je považován za „zlatý standard“ v oblasti výzkumu RKB. Jde však o velmi časově náročnou studii, růst nádorů a následná transplantace do dalších jedinců může trvat i řadu měsíců.

Existuje i několik postupů, jak identifikovat a obohatit populaci RKB *in vitro*. Jde například o postupy sledující zachování značení v buňkách s “kmenovými” vlastnostmi, na rozdíl od proliferujících buněk. Jinou možností je sledování schopnosti vytvářet kolonie buněk v matrigelu nebo v polotekutém médiu, čímž identifikujeme buňky se zvýšeným proliferačním potenciálem. Mimo to jsou používány techniky založené na sortování buněk a použití specifických protilátek povrchových proteinů. Dalším z možných přístupů jak studovat RKB *in vitro* je pěstování buněk v podobě neadherentních sfér. Tento postup byl odvozen od protokolu pro studium neurálních kmenových buněk (Reynolds and Weiss, 1996; Rietze and Reynolds, 2006; Weiss et al, 1996) a je v současné době jedním z nejvíce používaných postupů kultivace RKB. Neurální buňky jsou převedeny do speciálního bezsérového média s dodatkem růstových faktorů, ve kterém vytváří plovoucí kolonie, tzv. neurosféry. Neurosféry obsahují neurální kmenové buňky a dále progenitorové buňky v různém stádiu diferenciaci (Reynolds and Rietze, 2005; Rietze and Reynolds, 2006).

Dontu et al (2003) vycházeli z protokolu pro pěstování neurosfér a vytvořili analogický postup pro pěstování kmenových buněk prsní žlázy a RKB rakoviny prsu. Postupně byla kultivace v podobě mammosfér otestována i u nádorových linií rakoviny prsu (Cariati et al, 2008; Charafe-Jauffret et al, 2009; Ponti et al, 2005) a u

metastazující rakoviny prsu (Grimshaw et al, 2008). Neadherentní mammosféry jsou pěstovány v médiu bez séra v přítomnosti epidermálního a fibroblastového růstového faktoru. Tyto podmínky neumožňují přisednutí buněk k podkladu, což vede k “anoikis“ (apoptotická smrt z nedostatku signálů pro přežití při ztrátě kontaktu s extracelulární matrix) většiny populace. Menší část buněk však v tomto prostředí přežije a tvoří plovoucí kolonie (Dontu et al, 2003). Tyto kolonie jsou obohacené o nediferencované buňky a v přítomnosti séra vykazují schopnost diferencovat do fenotypově různorodé populace. Další vlastností mammosférických buněk je schopnost vylučovat barvivo Hoechst 33342 a vytvářet tzv. „postranní“ (side) populaci (SP), což je považováno za významnou vlastnost buněk s kmenovými vlastnostmi (Hirschmann-Jax et al, 2004; Huang et al, 2010a; Zhou et al, 2009).

Dle nových poznatků si kmenové vlastnosti mammosféry udržují pouze do přibližně páté pasáže. Poté dochází ke snižování jejich proliferačního potenciálu a zvyšuje se aktivita β -galaktosidázy značící zvýšené množství buněk, u kterých dochází k procesům senescence (Dey et al, 2009).



Obrázek 2. Postup kultivace mammosfér.

Ve speciálním bezsérovém MS médiu dojde k vytvoření mammosfér, tvořených kolonií buněk, vzniklých z jedné RKB. Buňky v rámci jedné mammosféry jsou diferencovány do fenotypově různorodé populace, ale obsahují i další RKB. To dokazuje schopnost RKB se zároveň sebeobnovovat i diferencovat do různých fenotypů. Po disociaci mammosféry a nasazení do čerstvého MS média, ale přežijí a nové sféry vytvoří pouze RKB. Mammosféry z nádorových linií je vhodné pasážovat maximálně pětkrát. Poté začíná docházet k vyšší kumulaci buněk vykazujících senescenci a k poklesu proliferačního potenciálu. Upraveno dle Dontu et al (2003).

2. 5. ErbB-2 onkogen a jeho role v rakovinných kmenových buňkách

ErbB-2 (HER2) je 185 kDa velký transmembránový protein z rodiny receptorů epidermálních růstových faktorů (EGF), identifikován a popsán byl v roce 1987 (Slamon et al). Rodina EGF je složena ze 4 členů: EGFR (erbB-1), erbB-2 (HER2), erbB-3 (HER3) a erbB-4 (HER4). Zatímco název ErbB-2 je užíván pro gen lidský i myší napříč druhy, HER2 odkazuje na lidský gen a jeho proteinový produkt a neu na myší gen a produkt.

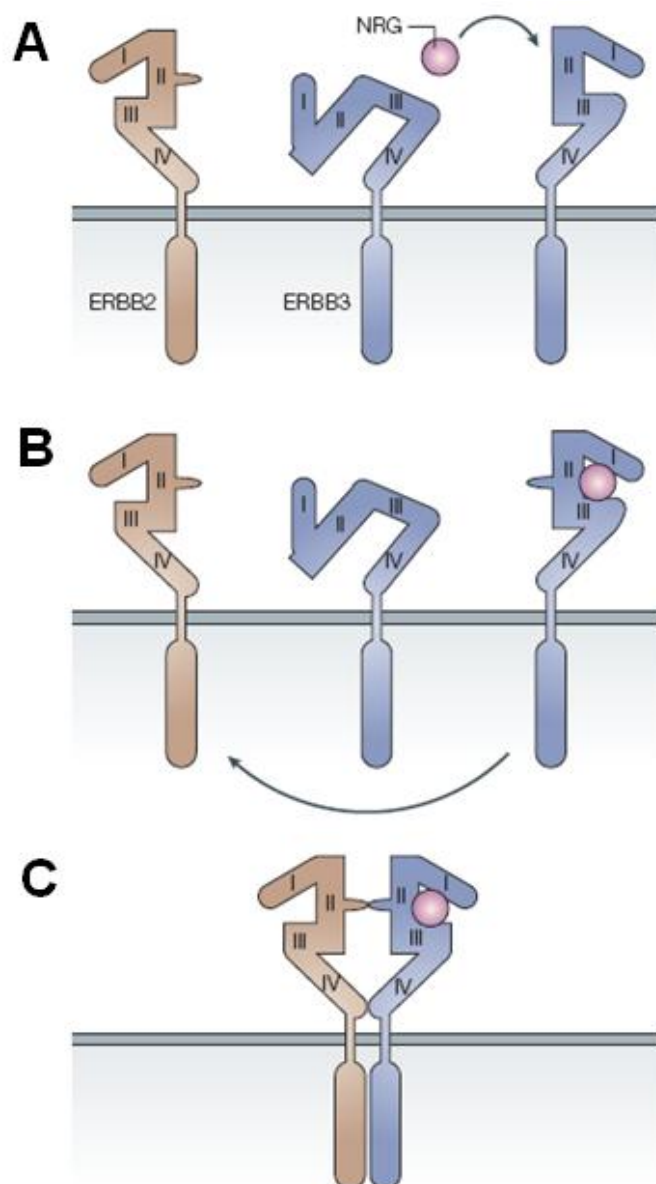
EGF receptory se účastní mnoha buněčných odpovědí, např. regulace proliferace, vývoje buněk, angiogeneze, buněčného cyklu a apoptózy. Deregulace této signalizace vede k široké škále onemocnění. Zvýšená exprese nebo nesprávná funkce receptorů je spojována s řadou typů rakoviny, např. rakoviny prsu, plic, nádory mozku atd. Amplifikace receptoru erbB-2 byla zjištěna u 25-30% všech nádorů prsu a je spojena s horší prognózou onemocnění a zvýšenou schopností nádorů metastázovat (Slamon et al, 1989).

2. 5. 1. Signalizace EGF receptory

Struktura EGF receptorů spočívá v ligand-vazebné doméně spojené transmembránovým helixem s cytoplazmatickou doménou. Cytoplazmatická doména nese tyrozin kinázovou aktivitu a je obklopena regulačními sekvencemi, které mohou být autofosforylovány nebo fosforylovány dalšími proteinovými kinázami. Extracelulární doména váže ligand, což vede k vytvoření homo- nebo heterodimerů členů EGFR rodiny a následné autofosforylaci. Ligandy pro EGFR jsou epidermální růstový faktor, epiregulin, TGF- α a další. Ligandy erbB-3 a erbB-4 se nazývají neureguliny a sestávají z rodiny sestřihových variant čtyř genů pro neuregulin (Stove and Bracke, 2004). Na rozdíl od ostatních členů rodiny, pro erbB-2 dosud žádný fyziologický ligand nebyl objeven. Z toho se usuzuje, že hlavní funkcí tohoto člena EGFR rodiny je být partnerem pro tvorbu heterodimerů, jež vytváří se všemi ostatními členy rodiny. ErbB-2 v heterodimerech funguje jako zesilovač signalizace, protože heterodimery obsahující erbB-2 mají nejsilnější signalizační potenciál

(Tzahar et al, 1996). V rodině EGF receptorů je silně rozvinutá funkční diferenciací a tedy i závislost jednotlivých členů na ostatních. Příkladem může být heterodimer erbB-2/erbB-3 (Obr. 3). ErbB-3 je sám o sobě katalyticky inaktivní. ErbB-2, který postrádá vlastní ligand, je na rozdíl od ostatních členů rodiny konstitutivně v aktivní konformaci, umožňující dimerizaci. Tato konformace zároveň znemožňuje vazbu jakéhokoliv ligandu, protože místo pro vazbu ligandu je v tomto stavu nepřístupné (Garrett et al, 2003). Signální funkce tak oba proteiny získají až po heterodimerizaci. Dohromady heterodimer erbB-2 a erbB-3 tvoří nejsilněji signalizující komplex v rámci EGFR rodiny (Tzahar et al, 1996).

Otázka ligandů pro erbB-2 však byla v nedávné době opět otevřena, když Alvarado et al (2009) popsali, že struktura erbB-2 se značně podobá EGF receptoru u *Drosophila melanogaster*, který je striktně regulován růstovými faktory a že taková regulace je pravděpodobná i u lidského erbB-2.



Obr. 3. Struktura extracelulární domény receptorů *erbB-2* a *erbB-3*.

(A) Extracelulární domény receptorů EGFR rodiny jsou složeny ze čtyř domén (I-IV). Doména I a III se účastní vazby ligandu, doména II slouží jako dimerizační doména pro přímou vazbu partnerského receptoru. (B) Kromě *erbB-2* jsou všechny EGF receptory běžně ve sbalené struktuře, kdy je dimerizační doména nepřístupná, tato konformace se mění po vazbě ligandu a dochází k dimerizaci s partnerským EGF receptorem. Ligandy pro *erbB-3* se nazývají neureguliny. (C) *ErbB-2* je naopak stále v konformaci, připomínající aktivní stav ostatních receptorů rodiny a je tedy kdykoliv schopen dimerizovat. Místo pro vazbu ligandu je proto u *erbB-2* stabilně nepřístupné. Upraveno dle Hynes and Lane (2005).

2. 5. 2. Amplifikace erbB-2 a proces transformace

Amplifikace a zvýšená exprese erbB-2 byla dokumentována v přibližně jedné čtvrtině všech nádorů prsu (Slamon et al, 1987), v rakovině žaludku (Jaehne et al, 1992), vaječníků (Vermeij et al, 2008) a dalších. Amplifikace erbB-2 receptoru je považována za časnou událost ve vývoji nádoru prsu (Park et al, 2006). Zvýšená exprese erbB-2 v rakovině prsu spočívá v amplifikaci genu na počet přibližně 25 až 50 kopií a v 40 až 100 násobném vzrůstu exprese proteinu erbB-2. Výsledkem je exprese až 2×10^6 molekul receptoru na povrchu jedné rakovinné buňky (Moasser, 2007). Na rozdíl od myšího homologu neu se u lidského HER2 v rakovině prsu nevyskytují mutace, které by vedly k jeho aktivaci a onkogenní účinky jsou tak zajištěny pouze zvýšenou expresí proteinu. Mutace HER2 v kinázové doméně jsou však popsány v nemalobuněčném karcinomu plic (Wang et al, 2006). Zvýšená exprese proteinu erbB-2 na povrchu rakovinných buněk vede k formování dimerů erbB-2 a následně k zesílení erbB-2 signalizace, což vede k aktivaci proliferace, deregulaci buněčné polarity, adhezivity a k prodlouženému přežívání buněk. V nádorech prsu byla dokumentována i zvýšená exprese erbB-3, který vytváří s erbB-2 heterodimery. Nefunkční erbB-3 signalizace měla za následek ztrátu schopnosti erbB-2 transformovat buňky do maligního fenotypu (Holbro et al, 2003).

Expresí erbB-2 je regulována transkripčními faktory. Například FOXP3, X-vázaný transkripční faktor z rodiny FOX, je silným represorem erbB-2 promotoru. Zuo et al (2007) zjistili, že vzorky rakoviny prsu se zvýšenou expresí erbB-2 mají zároveň deletovaný, mutovaný nebo méně exprimovaný FOXP3 transkripční faktor. FOXP3 dále inhiboval růst i v nádorových liniích, které nemají výrazně zvýšenou expresi erbB-2, např. MCF7 linie. Zdá se tedy, že *FOXP3* udržuje regulaci promotoru *ErbB2* nízké hladiny exprese tohoto onkogenu a je důležitým supresorem rakoviny prsu.

Dalším regulátorem exprese erbB-2 je protein AP-2 (aktivační protein 2). Rodina AP-2 proteinů tvoří homo- a heterodimery, které rozpoznávají GC-bohaté oblasti DNA. Mohou přímo aktivovat nebo reprimovat promotory mnoha genů, mimo jiné i genu pro erbB-2 (Bosher et al, 1995). Zvýšená aktivita AP-2 vede spolu s amplifikací genu pro *ErbB2* k jeho zvýšené expresi. AP-2 zároveň reguluje i transkripci dalších členů EGFR rodiny, EGFR a erbB-3. Vazba AP-2 je spolu

s dalšími transkripčními faktory z rodiny Ets (zvl. protein PEA3) nutná k plné aktivaci *ErbB2* promotoru a oba faktory jsou asociovány se zvýšenou expresí *erbB-2* v rakovině prsu (Benz et al, 1997; Pellikainen and Kosma, 2007). PEA3 aktivuje dále i geny účastníci se štěpení extracelulární matrix a zvyšuje tak invazivitu buněk (Benz et al, 1997). Úloha transkripčního faktoru PEA3 je ale dosud kontroverzním tématem. Existují i práce, které ukazují, že PEA3 působí jako represor *erbB-2* promotoru (Xing et al, 2000). Nicméně nedávné studie předkládají PEA3 spíše jako protumorigenní faktor asociovaný se zvýšenou expresí *erbB-2* (Baker et al, 2010; Myers et al, 2006).

2. 5. 3. Dráhy deregulované v kontextu *erbB-2* signalizace

ErbB-2 signalizace je spojena s mnoha dalšími signálními drahami. Hladina proteinu *erbB-2* je regulována Notch-1 faktorem, který zároveň ovlivňuje udržování normálních kmenových buněk mléčné žlázy (Magnifico et al, 2009). Notch-1 je klíčovým regulátorem asymetrického dělení kmenových buněk mléčné žlázy (Clarke et al, 2005).

Mezi nejdůležitější signální dráhy spojené s *erbB-2* patří signalizace přes PI3K kinázu. *ErbB-2* v heterodimeru s *erbB-3* aktivuje PI3K/Akt signální dráhu (Holbro et al, 2003). Aktivace PI3K vede k fosforylaci Akt kinázy. PTEN fosfatáza defosforyluje fosfatidylinositol-(3,4,5)-trisfosfát a působí tak jako negativní regulátor PI3K/Akt signální dráhy. Nefunkční PTEN fosfatáza byla nalezena u téměř poloviny nádorů prsu a bylo prokázáno, že jde o jeden z mechanismů rezistence nádorů prsu vůči terapii trastuzumabem (Herceptin) (Nagata et al, 2004). Akt signalizace funguje jako křižovatka mnoha signálů, které mají kritickou roli v kancerogenezi: jde zvláště o rovnováhu mezi apoptózou a přežitím buňky, invazivitu, angiogenezi, metabolismus glukózy atd. Bylo zjištěno, že aktivace Akt ve vzorcích karcinomu prsu je spojena se zvýšenou expresí *erbB-2* (Park and Kim, 2007). Zvýšená hladina fosforylace Akt byla zjištěna i u mammosfér kmenových buněk prsu v porovnání s normálními epiteliálními buňkami (Korkaya et al, 2009). Další významná dráha účastníci se v regulaci kmenových buněk je Wnt/ β -katenin (Brennan and Brown, 2004). β -katenin je aktivován v mammosférách více než v přisedlých epiteliálních

buňkách (Korkaya et al, 2009) a pravděpodobně hraje roli v udržování populace kmenových buněk prsu. Zvýšená exprese β -kateninu vede ke zvýšenému množství kmenových buněk a je spojována s horší prognózou nádorů prsu (Al-Hajj et al, 2003). Zvýšená aktivita Wnt byla popsána u RKB rakoviny tlustého střeva (Vermeulen et al, 2010).

Zvýšená exprese erbB-2 dále vede k aktivaci NF- κ B dráhy. Tato rodina transkripčních faktorů zprostředkuje aktivaci exprese genů účastnících se buněčného růstu, přežívání i maligní transformace. Tato dráha je v erbB-2⁺ buňkách aktivována prostřednictvím aktivace výše zmíněné PI3K/Akt dráhy (Pianetti et al, 2001).

Metastatický potenciál buněk exprimujících erbB-2 je spojen s expresí chemokinového receptoru CXCR4. ErbB-2 zvyšuje expresi CXCR4, který je zodpovědný za zvýšenou invazivitu, migraci buněk a změněnou adhezivitu (Muller et al, 2001). Ligandem tohoto receptoru je SDF-1 faktor, který je ve velkém množství uvolňován plicemi, játry a kostní tkání. Nádorové buňky exprimující CXCR4 se uvolňují z nádoru do krevního řečiště a jsou rekrutovány do míst s vysokou koncentrací SDF-1 faktoru, kde vytvářejí metastáze (Freudenberg et al, 2009).

Signalizace erbB-2 je více či méně spojena i s dalšími drahami zahrnujícími signální dráhy Hedgehog, ras, src atd. Spojení s těmito drahami zprostředkuje rakovinným buňkám exprimujícím erbB-2 zvýšenou rezistenci k léčbě, invazivitu a schopnost metastázovat.

2. 6. Léčebné strategie

Vzhledem ke špatné prognóze rakoviny prsu se zvýšenou expresí erbB-2/HER-2 byly vyvinuty léčebné strategie, zacílené na tento onkoprotein. Jde o rekombinantní protilátky cílené na erbB-2 a další členy EGFR rodiny.

Trastuzumab (Herceptin), humanizovaná monoklonální protilátka IgG₁ váže extracelulární doménu erbB-2 je s určitým úspěchem podávána pacientkám s rakovinou prsu vykazující zvýšenou expresi erbB-2 (Vogel et al, 2002). Většina pacientek s metastatickou erbB-2⁺ rakovinou prsu si však přes počáteční dobré výsledky léčby trastuzumabem vytvoří rezistenci. Rezistence k trastuzumabu se běžně objevuje řádově během měsíců až let od zahájení léčby. Rezistence k léčbě trastuzumabem samotným se objevuje až u 70% případů metastatické rakoviny prsu se zvýšenou expresí erbB-2 a až u 15% případů dojde k vytvoření rezistence k trastuzumabu i přes kombinaci s chemoterapií (Oliveras-Ferraros et al, 2010; Vogel et al, 2002). Další komplikací léčby trastuzumabem je jeho kardiotoxicita (Guglin et al, 2009). Rezistence k terapii zaměřené na erbB-2 je v současné době vzrůstajícím klinickým problémem. Rezistence je zprostředkována zvláště v důsledku inaktivace PTEN a aktivace signální dráhy PI3K/Akt (Nagata et al, 2004).

Pertuzumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka, patřící do skupiny tzv. dimerizačních inhibitorů. Tato látka zabraňuje tvorbě dimerů mezi erbB-2 a EGFR či erbB-3. Pertuzumab se váže na jiný epitop erbB-2 než trastuzumab a předpokládalo se, že by mohl být účinný v případě nádorů rezistentních k trastuzumabu. Tato protilátka je v současné době ve fázi II klinických testů. Účinnost pertuzumabu jako monoterapeutika se však neprokázala (Gianni et al, 2010), k částečnému zlepšení onemocnění dochází při podání pertuzumabu spolu s trastuzumabem (Baselga et al, 2010).

Lapatinib je duální inhibitor tyrosin kináz účinný proti erbB-2 a EGFR. Tato protilátka vykazuje prodlouženou dobu interakce se substrátem, což umožňuje déle trvající inhibiční účinek (Wood et al, 2004). V *in vitro* studiích indukuje lapatinib

apoptózu v trastuzumab-rezistentních buňkách (Nahta et al, 2007). V klinických studiích byla prokázána aktivita lapatinibu jako monoterapie i ve spojení s chemoterapií (Curran, 2010), dále je lapatinib testován v podání spolu s trastuzumabem, neboť tyto protilátky vykazují synergistické účinky (Collins et al, 2009). Li et al (2008) nedávno ukázal, že lapatinib ve spojení s chemoterapií může vést k eliminaci RKB.

2. 7. Onkogen ErbB-2 a rakovinné kmenové buňky

Pro léčbu nádorů s rezistencí k trastuzumabu bude nezbytné odhalit mechanismy, které vedou ke zvýšené agresivitě erbB-2⁺ nádorů prsu. Rezistence rakoviny prsu k léčbě zacílené na erbB-2 je v současné době často dávána do souvislosti s teorií RKB. ErbB-2⁺ buňky jsou považovány za buňky nesoucí deregulace signálních drah vedoucí ke kmenovému fenotypu spojenému s vyšší rezistencí, zvýšenou invazivitou a vyšším metastatickým potenciálem. Zdá se tedy, že zvýšená exprese erbB-2 spolu s expresí dalších markerů kmenovosti je vlastností RKB populace rakoviny prsu. Z nedávných výzkumů navíc plyne, že exprese erbB-2 spouští v nádorových buňkách dráhy, které vedou k obohacování RKB populace.

Korkaya et al (2008) ukázali, že zvýšená exprese erbB-2 vede k nárůstu populace normálních i rakovinných kmenových buněk prsní žlázy. RKB i normální kmenové buňky a časně progenitory identifikovali autoři pomocí zvýšené aktivity enzymu ALDH, jak již bylo dříve ukázáno (Ginestier et al, 2007). ALDH-pozitivní buňky se zvýšenou expresí erbB-2 tvořily mammosféry a byly schopny iniciovat tvorbu nádorů v NOD/SCID myši. Naproti tomu, buňky exprimující erbB-2, které však byly ALDH-negativní netvořily mammosféry, ani nevytvářely nádory v NOD/SCID myši. Dále autoři ukázali, že ALDH⁺ buňky se zvýšenou expresí erbB-2 vykazovaly vyšší expresi markerů spojených s kmenovými vlastnostmi, např. aktivace Akt, Notch a Hedgehog signální dráhy a Oct-3/4 genu. Zvýšená exprese erbB-2 dále vedla ke zvýšené invazivitě buněk, podobně jako bylo prokázáno u CD44⁺/CD24⁻ populace. Naopak při snížení exprese erbB-2 v nádorové linii HCC1954 autoři pozorovali pokles procenta populace ALDH⁺ buněk a tedy i pokles procenta RKB. Magnifico et

al (2009) ukázali, že buňky v rakovinných liniích vykazující kmenové vlastnosti, např. tvorbu mammosfér, mají zároveň zvýšenou expresi erbB-2.

Nedávno bylo také prokázáno, že erbB-2 reguluje „side“ populaci nádorových buněk, která je podobně jako ALDH⁺ populace považována za populaci zahrnující frakci RKB (Nakanishi et al, 2010). Dále bylo v této studii zjištěno, že exprese erbB-2 se v rámci této populace uskutečňuje zvláště na buňkách patřících do „side“ subpopulace. Zhou et al (2010) v analýze publikovaných dat o roli RKB v klinických studiích potvrdili, že RKB rakoviny prsu se mimo jiné vyznačují právě zvýšenou expresí erbB-2.

V další studii bylo prokázáno, že EGRF signalizace je nutná pro sebeobnovování rakovinných kmenových buněk a erbB-2⁺ nádorové buňky mají schopnost sebeobnovování zvýšenou (Farnie et al, 2007). Souvislost EGFR signalizace se schopností sebeobnovování v rakovinných buňkách později potvrdil Li et al (2008). V této studii prokázali, že RKB jsou rezistentní vůči konvenční chemoterapii. Tyto buňky přežily chemoterapeutickou léčbu a vykazovaly zvýšenou schopnost tvorby mammosfér a vyšší schopnost iniciovat tvorbu nádorů v experimentální myši. Léčba lapatinibem, který je zacílen na erbB-2 a EGFR, však vedla k malému poklesu procenta RKB po terapii i k poklesu jejich schopnosti tvořit mammosféry.

Dohromady tyto výsledky vypovídají o důležité roli erbB-2 signalizace v udržování RKB populace nádorů prsu. Pro hlubší pochopení mechanismů, kterými zvýšená exprese erbB-2 ovlivňuje rakovinné kmenové buňky, bude však třeba dalších studií.

3. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo pomoci objasnit roli onkogenu *erbB-2* (HER2) v procesu tvorby a udržování fenotypu rakovinných kmenových buněk na modelu mammosfér vytvořených z lidských nádorových linií MCF7 a MDA-MB-453. Dále bylo v plánu zjistit, zda hladina exprese proteinu *erbB-2* ovlivňuje schopnost iniciace nádorového bujení při přenosu do experimentální athymické myši kmene Balb/c *nu-nu*. Otázky plynoucí z takto stanovených cílů jsme řešili v následujících krocích:

3. 1. Rakovinné kmenové buňky (RKB)

- Zavést metodu kultivace rakovinných kmenových buněk rakoviny prsu na modelu buněčných linií MCF7 a MDA-MB-453;
- Porovnat expresi vybraných genů parentálních nádorových buněk versus mammosfér u MCF7 a MDA-MB-453 buněk;
- Charakterizovat měnící se expresi vybraných genů v průběhu utváření fenotypu RKB u MCF7 buněk.

3. 2. Role onkogenu *ErbB2* v procesu utváření a udržování mammosférového fenotypu

- Připravit stabilní linii MCF7 buněk se sníženou hladinou exprese proteinu *erbB-2*;
- Porovnat expresi genů u *erbB-2*-deficientních buněk, buněk nesoucích kontrolní „non-silencing“ (NS) plazmid a parentálních MCF7 buněk;
- Připravit mammosféry z *erbB-2*-deficientních buněk;

3. 3. Schopnost buněk vytvářet nádory v imunodeficientních myších

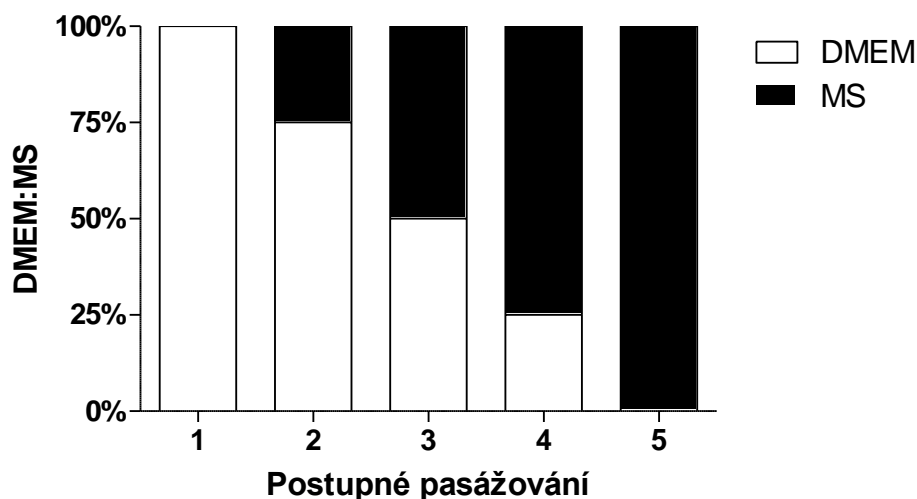
- Porovnat schopnost iniciovat tvorbu nádoru v experimentální Balb/c *nu-nu* myši u parentálních buněk a *erbB-2*-deficientních buněk.

4. Materiál a metody

4. 1. Kultivace buněk

V experimentech jsme používali dvě adherentní lidské buněčné linie rakoviny prsu: MCF7 a MDA-MB-453. Linie MCF7 pochází z roku 1970 od 69leté ženy, jedná se o primární nádor (Soule et al, 1973). Linie MDA-MB-453 byla izolována v roce 1976 z nádoru 48leté ženy a představuje metastazující rakovinu prsu (Cailleau et al, 1978). MDA-MB-453 buňky se vyznačují zvýšenou expresí erbB-2 oproti MCF7 linii (Neve et al, 2006). Buňky MCF7 a MDA-MB-453 byly kultivovány v DMEM médiu (Lonza) doplněném 10% FBS, 1% antibiotikem/antimykotikem (ATB) při 37°C a 5% CO₂.

Mammosféry byly kultivovány v médiu DMEM-F12 (Thermo Electron, Gibco) doplněném o Neurocult Neural Stem Cell Proliferation Supplement (StemCell Technologies), 20 ng/ml rhEGF (R&D Systems), 10 ng/ml rhFGF2 (R&D Systems), 1 µl/ml heparin, ve 37°C a 5% CO₂. Mammosféry jsme připravovali z parentálních linií postupným ředěním původního DMEM média bezsérovým mammosférovým médiem (MS médium) při pasážování. Převod do mammosférového média byl prováděn v pěti krocích (Obr. 4), buňky byly odděleny od podkladu pomocí trypsin/EDTA nebo EDTA/EGTA disociačním pufrem (1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% BSA v PBS), resuspendovány v médiu a doplněny DMEM a MS médiem v příslušném poměru. suspenzní sféry v MS médiu byly pasážovány, když dosáhly velikosti přibližně 70 µm. Sféry jsme stočili, odebrali médium a přidali 0,5 ml EDTA/EGTA pufru. Po 10 min inkubace s disociačním pufrem byly původní sféry rozděleny na jednotlivé buňky, které jsme po centrifugaci resuspendovali v čerstvém MS médiu. Do lahve T75 (plocha dna 75 cm²) bylo nasazeno ~1 x 10⁶ buněk.



Obr. 4. Schéma převodu parentálních buněk do mammosférového média.

Příprava mammosfér začíná u parentálních adherentních linií buněk MCF7/MDA-MB-453 v DMEM médiu (10% FBS a 1% ATB). Toto médium je při první pasáži vyměněno za médium obsahující 75% DMEM a 25% MS média. Při dalších pasážích se postupně snižuje obsah DMEM média ve prospěch MS média ve fázích: 50% DMEM/ 50% MS média, 25% DMEM/ 75% MS média a konečně 100% MS médium. Ve 100% MS médiu přežívají pouze mammosféry vzniklé z původně adherentních buněk. Mammosféry jsou dále pasážovány obvykle po dosažení velikosti $\sim 70 \mu\text{m}$ v průměru.

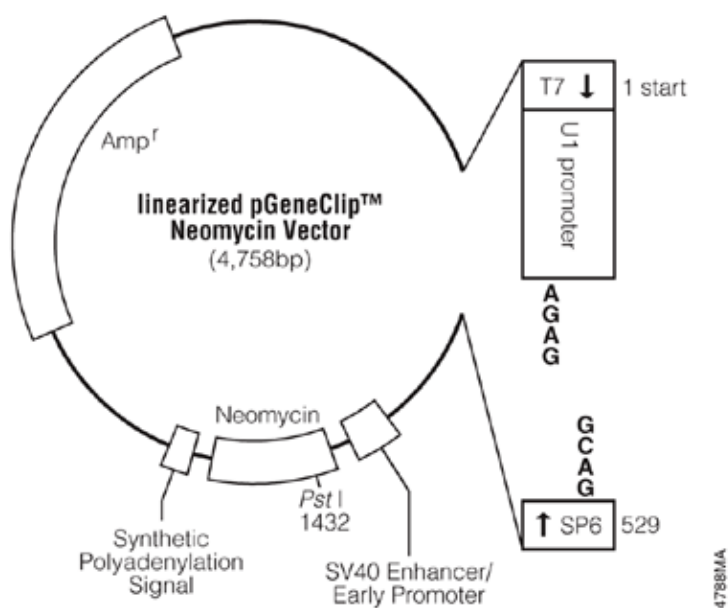
4. 2. Příprava stabilních linií

Pro přípravu linie MCF7 buněk se sníženou hladinou exprese proteinu erbB-2 jsme využili komerčně dostupný plazmid SureSilencing shRNA (SABiosciences). Plazmid s shRNA pro lidský *ERBB2* je v kitu obsažen ve 4 variantách s odlišnými sekvencemi a dále kit obsahuje kontrolní plazmid s NS („non-silencing“) shRNA. Mapa plazmidu je znázorněna na obr. 5.

Plazmidy jsme amplifikovali pomocí kompetentního kmene *E. coli* XL-1-Blue (Stratagene). Transformaci jsme provedli teplotním šokem (42°C, 45 s). Bakterie jsme vysadili na živné médium obsahující ampicilin a selektovali populaci, jež byla po přijetí plazmidu k ampicilinu rezistentní. Jednotlivé kolonie bakterií jsme poté namnožili v LB médiu. Po napěstování transformovaných bakterií jsme

amplifikovaný plazmid izolovali pomocí Plasmid Midiprep kitu (JetStar). Získanými plazmidy jsme transfekovali MCF7 buňky za použití transfekčního činidla Superfect (Qiagen). K vyizolovaným plazmidům jsme přidali transfekční činidlo a promíchali pomocí vortexu. S transfekčním činidlem jsme plazmidy inkubovali 10 min při pokojové teplotě. Poté jsme přidali médium DMEM (bez séra a bez antibiotik), promíchali a přidali takto naředěné plazmidy k buňkám MCF7. S buňkami jsme transfekční komplexy inkubovali po dobu 3 hod. Z transfekovaných buněk jsme poté selektovali populaci rezistentní vůči neomycinu. Pro MCF7 buňky jsme při selekci použili 400 µg/ml antibiotika G418 (Sigma). Selektované směsné populace jednotlivých plazmidů jsme pěstovali pod udržovací dávkou 100 µg/ml G418.

Selektované populace byly otestovány na hladinu proteinu erbB-2. Ze směsné populace buněk s vneseným plazmidem 1, jež vykazovala nejvyšší snížení hladiny proteinu erbB-2 jsme napěstovali klonální populace. Buňky jsme nasadili ve velmi nízké koncentraci (5×10^2 buněk/ml média, celkem 5×10^3 buněk na misku) do kultivační misky o průměru 10 cm a nechali narůst kolonie vzniklé z jedné buňky. Tyto kolonie jsme poté přesadili do dvou 24-jamkových destiček a napěstovali. Jednotlivé kolonie jsme otestovali na hladinu exprese erbB-2 pomocí FACS a vybrali klony, v nichž byl shRNA proces nejúspěšnější. Tyto klony byly v dalších pokusech využívány jako modelová linie MCF7 buněk se sníženou hladinou exprese proteinu erbB-2. Jako kontroly jsou využívány parentální buňky MCF7 a dále buňky MCF7 nesoucí kontrolní plazmid s NS shRNA.



Obr. 5. Mapa shRNA plazmidu pro lidský *erbB-2* (SABiosciences).

4. 3. Izolace RNA

RNA byla izolována z MCF7 a MDA-MB-453 linií a z nich vznikajících mammosfér pomocí Total RNA mini kitu (Bio-Rad). Pro reverzní transkripci RNA na cDNA bylo použito 500 ng RNA a oligo(dT)₁₈ primery pomocí RevertAid First strand cDNA Synthesis kitu (Fermentas). Koncentrace RNA a cDNA byla určována pomocí přístroje NanoDrop ND-1000.

4. 4. Kvantitativní Real-Time PCR (qPCR)

Pro kvantitativní PCR reakci jsme používali BioRadCFX96 cykler. Specifické primery o koncentraci 10 μ M byly smíchány s SsoFast Eva Green Supermix (Bio-Rad) a cDNA. cDNA jsme ředili na koncentraci odpovídající 100 ng cDNA na reakci. Reakce probíhala v celkovém objemu 10 μ l (5,5 μ l primery + Eva Green, 4,5 μ l cDNA).

Program PCR reakce byl následující: aktivace „Hot Start“ polymerázy probíhala při 98°C, 30s, denaturace 98°C, 5s, „annealing“ 60°C, 15s, extenze 72°C, 20s, reakce

proběhla v 36 cyklech. Pro ověření identity produktů jsme sledovali analýzu křivek tání. Pro porovnání hladin exprese mezi jednotlivými vzorky byl použit referenční gen *GAPDH*. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí BioRadCFX96 softwaru s využitím $\Delta\Delta ct$ metody.

Sekvence použitých specifických primerů:

<i>ABCG-2</i>	Forward 5'-CGAGCGCACGCATCCTGAGA-3' Reverse 5'-CGCGGGGAAGCCATTGGTGT-3'
<i>CD24</i>	Forward 5'-AGCAATGGTGGCCAGGCTCG-3' Reverse 5'-GCCGCCTTGGTGGTGGCATT-3'
<i>CD44</i>	Forward 5'-ACCTGGGATTGGTTTTTCATGGTTGT-3' Reverse 5'-TTCATTTGGCTCCCAGCCTGC-3'
<i>CD47</i>	Forward 5'-GTGGGTCCTGCCTGTGACGC-3' Reverse 5'-AGCAACAGCGCCGCTACCAG-3'
<i>ErbB-2</i>	Forward 5'-CACCCAAGTGTGCACCGGCA-3' Reverse 5'-GCACGTAGCCCTGCACCTCC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' Reverse 5'-GTGAGGGTCTCTCTTCTCCT-3'
<i>p53</i>	Forward 5'-CTTCGAGATGTTCCGAGAGC-3' Reverse 5'-TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT-3'
<i>POU5F1</i>	Forward 5'-GGAAGGTATTCAGCCAAACG-3' Reverse 5'-CTGGTTCGCTTTCTCTTTCG-3'
<i>Prominin - 1</i>	Forward 5'-CCCTAAATTTGCATGAAAGCACAAGGT-3' Reverse 5'-CAACGTAAATTTGTCCGACCAGTTC-3'
<i>Sox-2</i>	Forward 5'-AGGACCAGCTGGGCTACCCG-3' Reverse 5'-GCCAAGAGCCATGCCAGGGG-3'
<i>Vimentin</i>	Forward 5'-GCGACAACCTGGCCGAGGAC-3' Reverse 5'-GGTCAAGACGTGCCAGAGACGC-3'

4. 5. Průtoková cytometrie

Buňky pro přípravu vzorků analyzovaných pomocí průtokové cytometrie za využití přístroje na FACS Calibur (Becton Dickinson) byly odděleny od podkladu pomocí EDTA/EGTA disociačního pufru (10 min, 37°C) a dvakrát promyty studeným PBS. Pro zjištění hladiny exprese membránového proteinu erbB-2 jsme používali monoklonální protilátku anti-HER2/neu značenou R-phycoerytrinem (PE, Becton Dickinson), jež detekuje protein o velikosti 185 kDa. Jeden vzorek jsme inkubovali s 2,5 µl protilátky v 37,5 µl PBS po dobu 30 min ve tmě při pokojové teplotě, po inkubaci jsme vzorek promyli PBS a bezprostředně měřili fluorescenci na kanálu FL2-H. Jako kontrola byly používány nebarvené buňky. Vyhodnocení dat bylo prováděno pomocí softwaru FlowJo v 8.8.6.

4. 6. Experimentální myší model

Pro studium schopnosti jednotlivých linií buněk vytvářet nádor *in vivo* jsme použili athymickou Balb/c *nu-nu* myš. Myši jsou chovány v individuálně ventilovaných klecích (IVC, Tecniplast) ve sterilních podmínkách. Pro experiment jsme použili 4 Balb/c *nu-nu* samice. V průběhu experimentu byla každá z myší v samostatné IVC kleci.

Myším ve věku 8 týdnů bylo subkutánně vpraveno 100 µl suspenze buněk v 1% PBS do oblasti nad stehenním svalem. Jedna dávka obsahovala 3×10^6 buněk. Do myší jsme vpravovali erbB-2 deficientní buňky na levou stranu a kontrolní buňky MCF7 s shRNA NS plazmidem na pravou stranu. Po vnesení buněk jsme denně vizuálně kontrolovali, zda se vytváří nádory. Vzniklý nádor byl od velikosti $\sim 1 \text{ mm}^3$ pravidelně dvakrát týdně analyzován pomocí ultrazvukového zobrazovacího přístroje Vevo 770 (VisualSonics).

4. 7. Ultrazvukové zobrazování

Ultrazvukové snímání myších nádorů bylo prováděno pomocí přístroje Vevo770 (VisualSonics). Myš byla uspána v uspávací komoře pomocí inhalačního anestetika izofluranu ve směsi s kyslíkem a poté přenesena na nastavitelnou a vyhřívanou platformu. Další sedace probíhala pomocí náhlavního trychtýře s proudící směsí izofluranu - kyslík. Na místo nádoru byla nanесena vrstva ultrazvukového gelu a nádor byl zobrazen pomocí skenovací sondy RMV704 (VisualSonics) pracující v oblasti frekvence 20-40 MHz. Vyhodnocení objemu nádorů bylo provedeno pomocí softwaru od firmy VisualSonics.

4. 8. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí GraphPad Prism 5.03 softwaru (SanGiego, CA).

* označuje hladinu významnosti $p < 0,05$ (signifikantní)

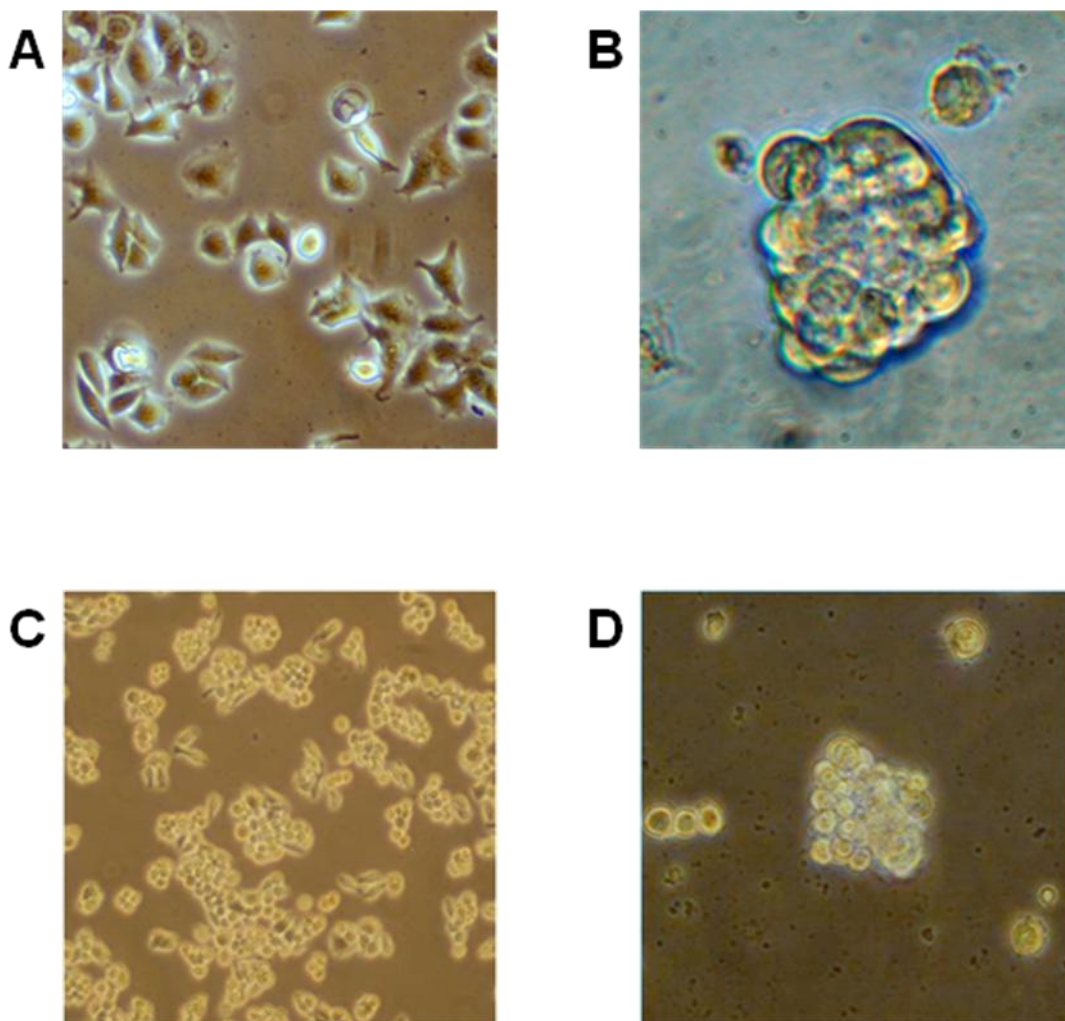
** označuje hladinu významnosti $p < 0,01$ (vysoce signifikantní)

*** označuje hladinu významnosti $p < 0,001$ (extrémně signifikantní)

5. Výsledky

5. 1. Kultivace rakovinných kmenových buněk rakoviny prsu

RKB byly kultivovány v podobě mammosfér ve speciálním bezsérovém médiu, doplněném růstovými faktory FGF a EGF a doplňkem pro podporu proliferace (MS médium). Do tohoto média jsme postupně převáděli parentální adherentní buňky tak, že jsme v jednotlivých pasážích zvyšovali poměr MS média vůči původnímu DMEM. Ve stoprocentním MS médiu jsme buňky kultivovali tři pasáže. Mammosféry jsme při pasáži stočili (10 min, 800 rpm), slili médium a rozdělili na jednotlivé buňky pomocí disociačního pufru (500 μ l disociačního pufru, 10 min, 37°C, 5% CO₂), poté jsme disociační pufr stočili a resuspendovali buňky v čerstvém MS médiu. Fotografie parentálních linií MCF7 a MDA-MB-453 a jejich mammosfér jsou na obr. 6.



Obr. 6. *Parentální buňky a mammosféry.*

Parentální buňky MCF7 (A), mammosféra MCF7 po 5 dnech v MS médiu (B). Parentální buňky MDA-MB-453 (C), mammosféra MDA-MB-453 po 5 dnech v MS médiu (D).

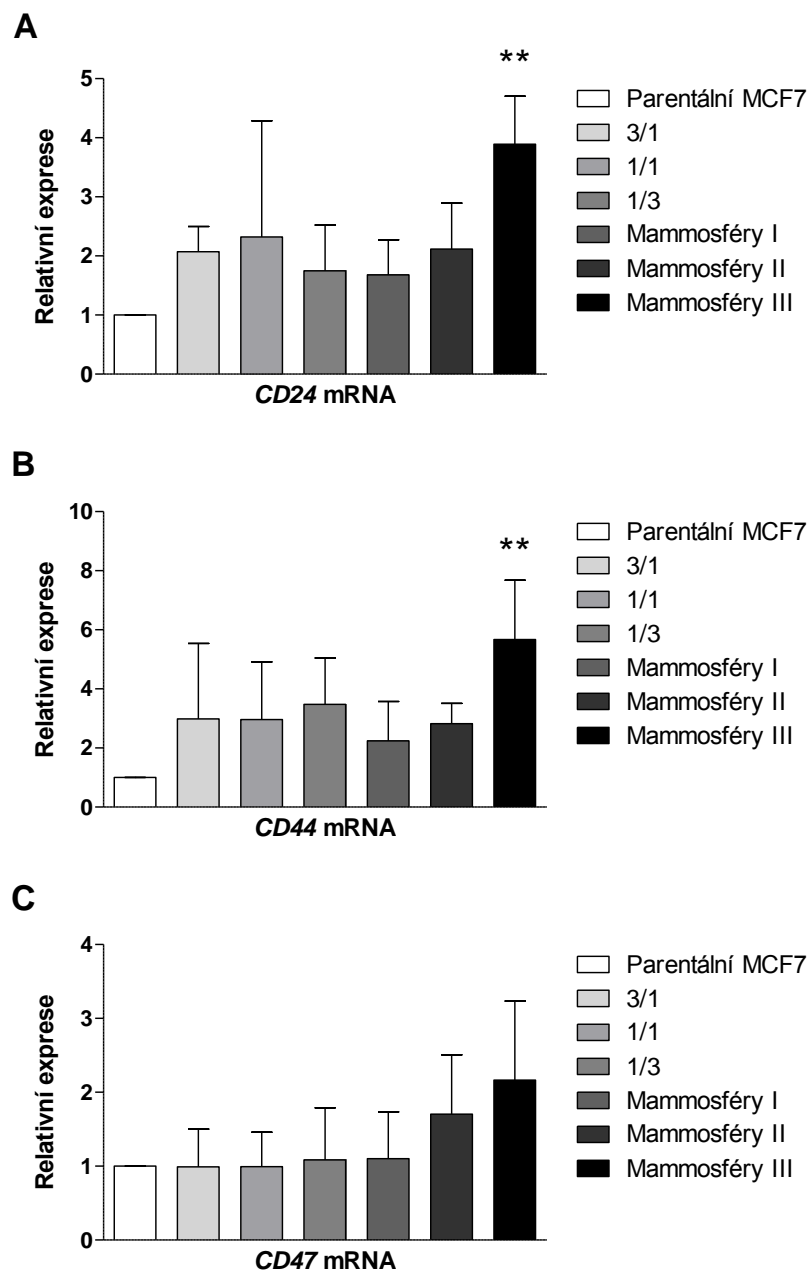
5. 2. Charakterizace genové exprese v průběhu utváření RKB

Real-Time PCR analýza MCF7 buněk v průběhu utváření mammosfér

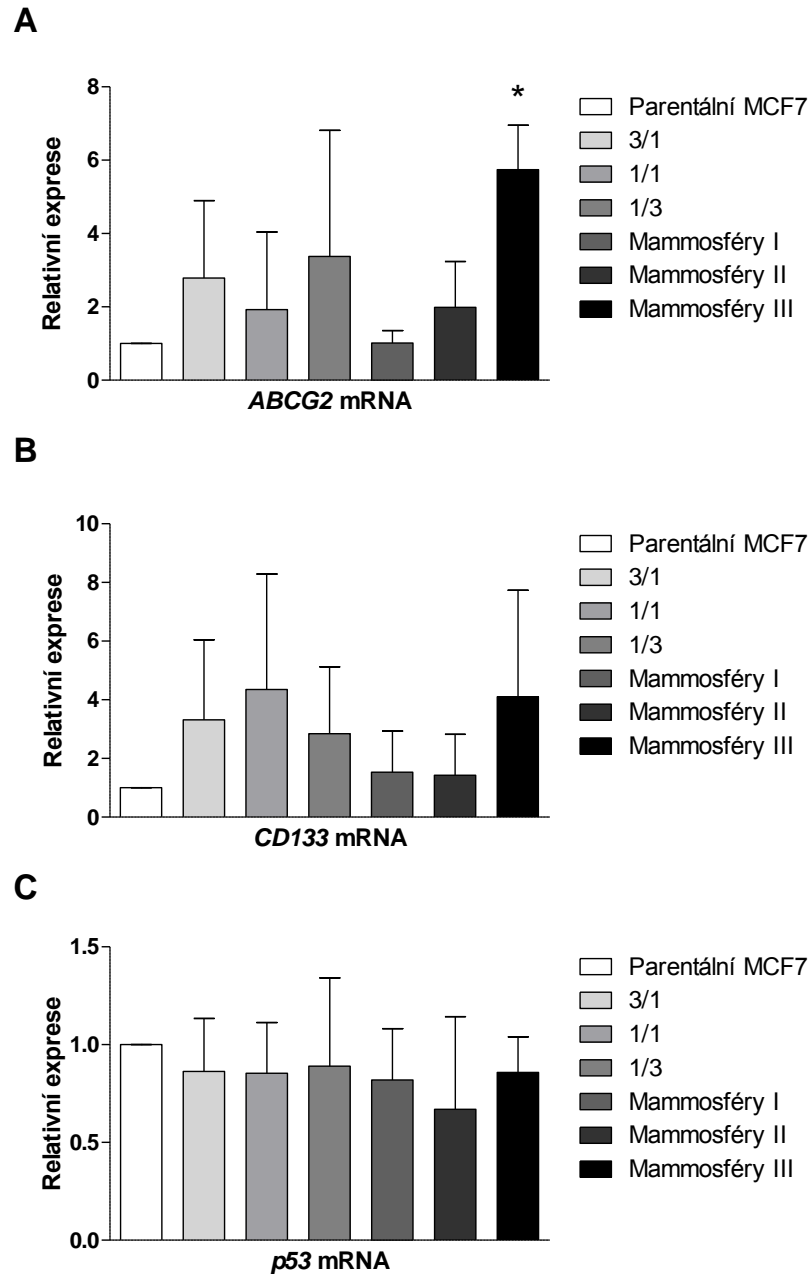
Izolace mRNA byla prováděna v každé z pasáží lišící se poměrem DMEM média a MS média. V analýze jsme testovali průběh změn exprese genů během vytváření mammosfér. Vzorky odpovídají jednotlivým pasážím:

- Parentální MCF7 buňky
- 75% DMEM: 25% MS (označeno 3/1)
- 50% DMEM: 50% MS (označeno 1/1)
- 25% DMEM: 75% MS (označeno 1/3)
- Mammosféry v 100% MS médiu, 1. pasáž (označeno Mammosféry I)
- Mammosféry v 100% MS médiu, 2. pasáž (označeno Mammosféry II)
- Mammosféry v 100% MS médiu, 3. pasáž (označeno Mammosféry III)

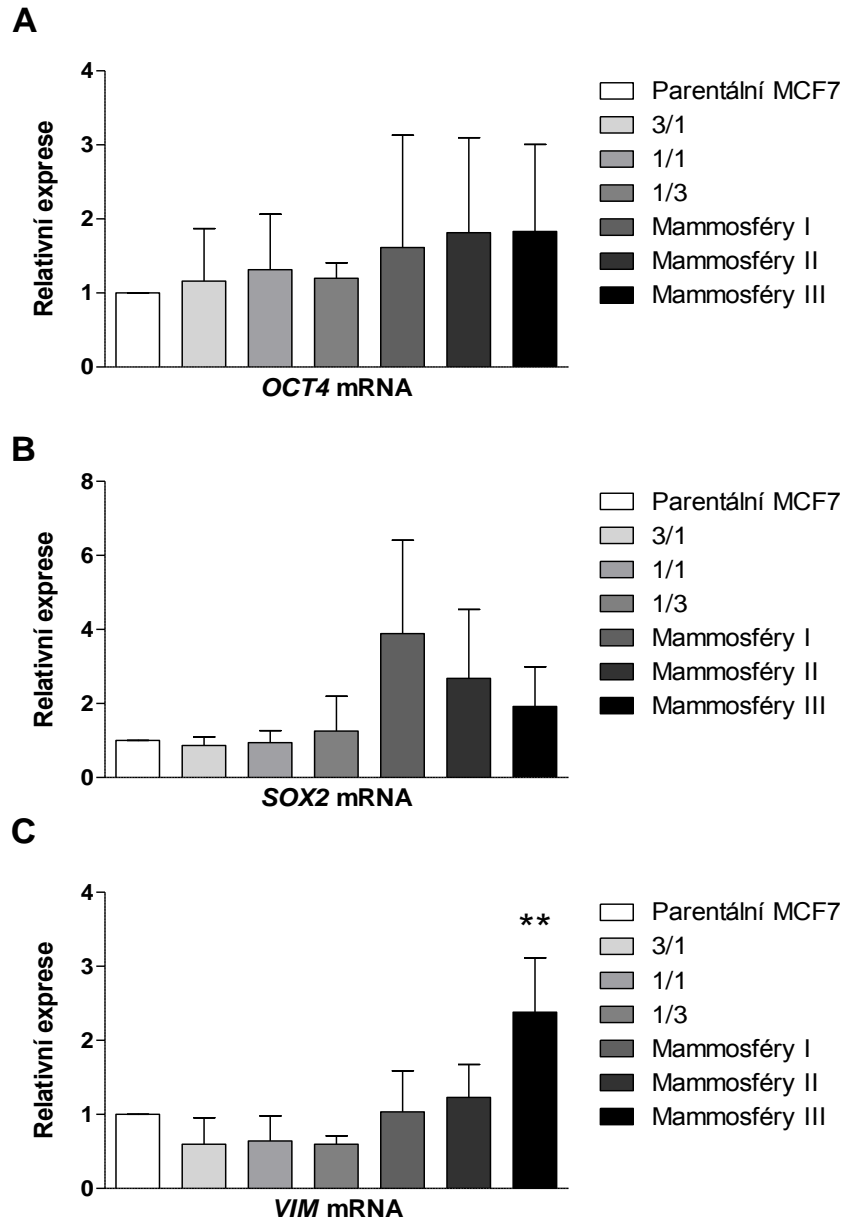
V každé z pasáží v 100% MS médiu (Mammosféry I – III) byly buňky kultivovány minimálně pět dní. Experiment byl třikrát nezávisle opakován. Real-Time PCR analýza byla provedena v duplikátech, jako referenční gen jsme použili *GAPDH*, vyhodnocení bylo provedeno v programu BioRadCFX96 pomocí $\Delta\Delta Ct$ metody. Statistická analýza byla provedena testem one-way ANOVA, dále byl použit Dunettův test pro porovnání jednotlivých vzorků s kontrolou (tj. MCF7 parentální buňky) a analýza lineárního trendu. Zobrazené odchylky znázorňují standardní odchylku měření.



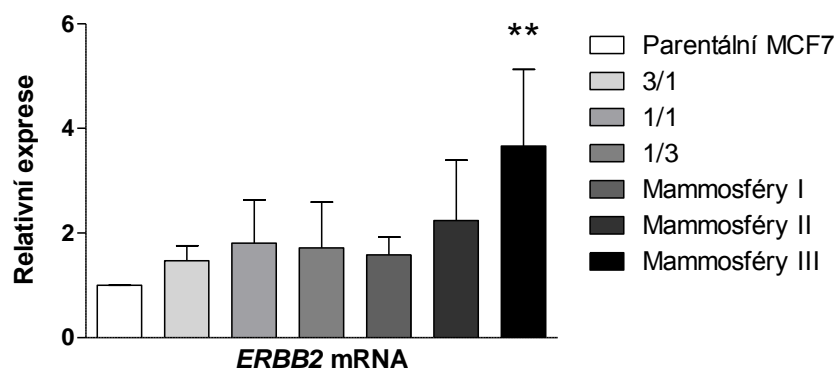
Obr. 7. MCF7 buňky. Expresa genů CD24, CD44 a CD47 v průběhu utváření mammosfér detekovaná pomocí qPCR. (A, B) Hladina exprese mRNA pro geny CD24 a CD44 je v Mammosférách III vysoce signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,01$). Statistické vyhodnocení bylo provedeno one-way ANOVA následovanou Dunett testem, oba geny vykazují i lineární trend ($p < 0,01$). (C) Hladina exprese mRNA pro gen CD47 není v Mammosférách III signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám podle Dunetta, ale vykazuje signifikantní lineární růstový trend ($p < 0,05$).



Obr. 8. MCF7 buňky. Expresa genů ABCG-2, CD133 a p53 v průběhu utváření mammosfér detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro gen ABCG-2 je v Mammosférách III signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení bylo provedeno one way ANOVA následovanou Dunett testem, gen vykazuje i lineární trend ($p < 0,01$). (B,C) Hladina exprese mRNA pro geny CD133 a p53 není v Mammosférách III signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám podle Dunetta, ani nevykazuje signifikantní lineární růstový trend.



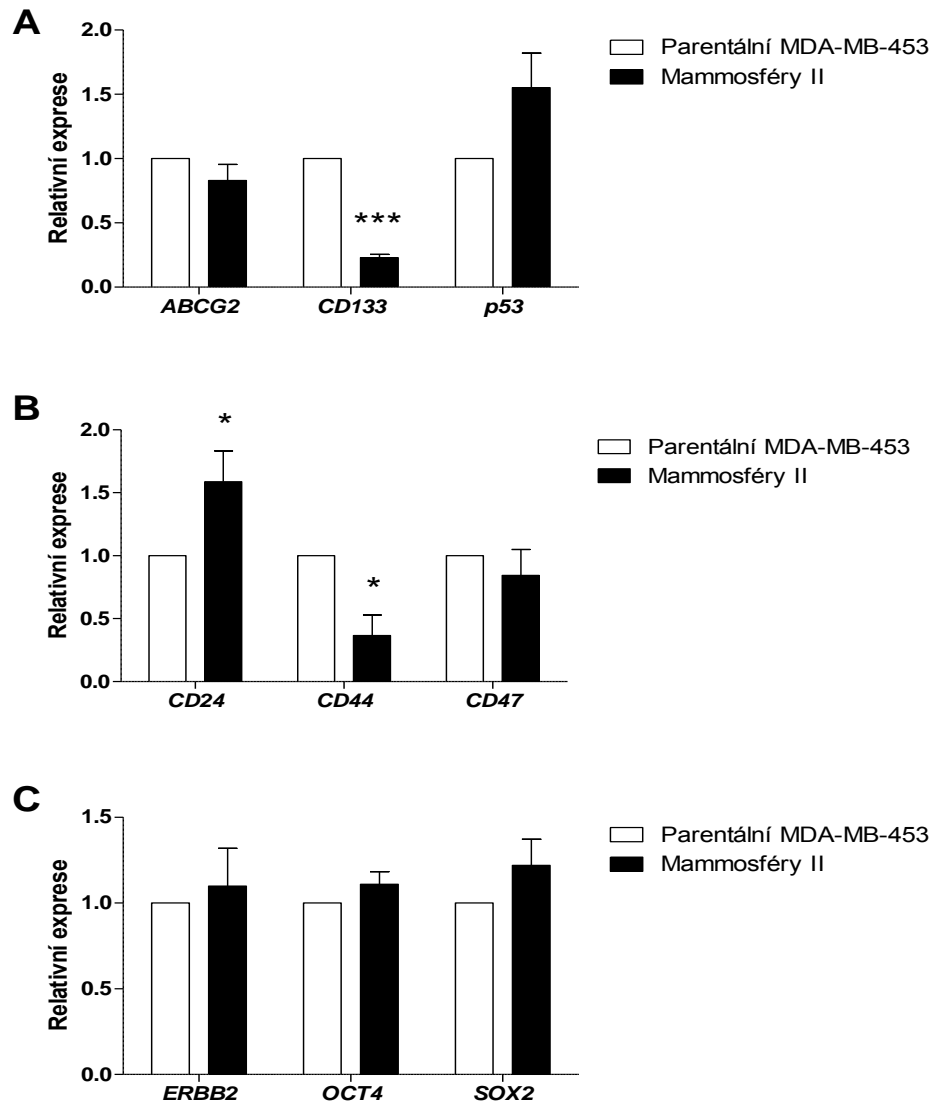
Obr. 9. MCF7 buňky. Expresa genů OCT4, SOX2 a Vimentinu v průběhu utváření mammosfér detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro gen OCT4 není v Mammosférách III signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám podle one way ANOVA následovanou Dunett testem, ani nevykazuje signifikantní lineární růstový trend. (B) Hladina exprese mRNA pro gen SOX2 není v Mammosférách III signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám podle Dunetta, gen vykazuje lineární růstový trend ($p < 0,01$). (C) Hladina exprese mRNA pro Vimentin je v Mammosférách III vysoce signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám. Statistika byla provedena Dunett testem ($p < 0,01$), gen vykazuje i lineární růstový trend ($p < 0,001$).



Obr 10. MCF7 buňky. Exprese genu *ERBB2* v průběhu utváření mammosfér detekovaná pomocí qPCR. Hladina exprese mRNA pro *erbB-2* je v Mammosférách III vysoce signifikantně zvýšena oproti parentálním MCF7 buňkám. Statistika byla provedena pomocí one way ANOVA následovanou Dunett testem ($p < 0,01$), gen vykazuje i lineární růstový trend ($p < 0,001$).

Real-Time PCR analýza buněk MDA-MB-453 a z nich připravených mammosfér.

V této analýze jsme testovali rozdíl mezi hladinou exprese genů v parentálních MDA-MB-453 buňkách a v mammosférách sklizených po 2. pasáži (označeno Mammosféry II). V každé z pasáží v 100% MS médiu (Mammosféry I – II) byly buňky kultivovány minimálně pět dní. Real-Time PCR analýza byla provedena v duplikátech, jako referenční gen jsme použili *GAPDH*, vyhodnocení bylo provedeno v programu BioRadCFX96 pomocí $\Delta\Delta\text{Act}$ metody. Experiment byl třikrát nezávisle opakován. Statistické vyhodnocení je provedeno t-testem. Zobrazené odchylky znázorňují standardní odchylku měření.



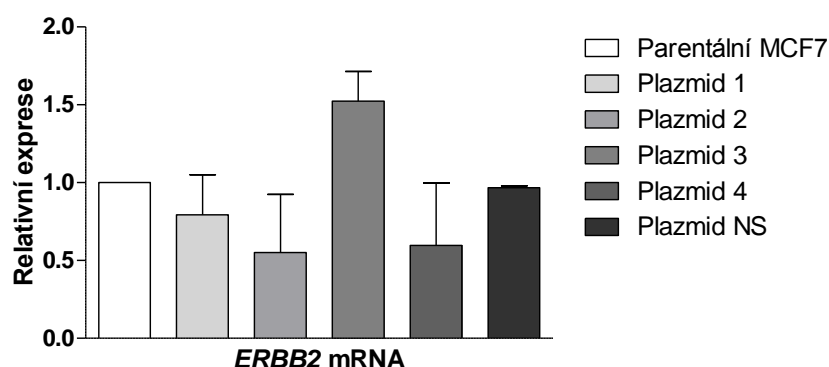
Obr. 11. MDA-MB-453 buňky. Expresse genů ABCG-2, CD133, CD24, CD44, CD47, ERBB2, OCT4, p53 a SOX2 v parentální populaci a v mammosférách po druhé pasáži detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro CD133 je extrémně signifikantně snížena u mammosfér MDA-MB-453 buněk v porovnání s parentálními buňkami ($p < 0,001$). Hladina exprese mRNA pro CD133 ani p53 u mammosfér není signifikantně změněna podle t-testu. (B) Hladina exprese mRNA pro CD24 je u mammosfér signifikantně zvýšena v porovnání s parentálními buňkami ($p < 0,05$). Hladina exprese mRNA pro CD44 je u mammosfér signifikantně snížena v porovnání s parentálními buňkami ($p < 0,05$). Hladina exprese mRNA pro CD47 není u mammosfér signifikantně snížena. (C) Hladina exprese mRNA pro geny ERBB2, OCT4 ani SOX2 není u mammosfér signifikantně zvýšena. Statistické vyhodnocení bylo provedeno t-testem.

5. 3. Role onkogenu erbB-2 v RKB

Pro studium role onkogenu erbB-2 v RKB jsme připravili stabilní linii MCF7 buněk se sníženou expresí erbB-2 pomocí shRNA metody.

Buňky transfekované jednotlivými plazmidy se 4 různými shRNA sekvencemi pro erbB-2 a buňky transfekované kontrolním plazmidem s NS shRNA jsme otestovali na hladinu mRNA pro erbB-2 pomocí Real-Time PCR analýzy. Real-Time PCR analýza byla provedena v duplikátech a vyhodnocena pomocí $\Delta\Delta\text{Ct}$ metody, jako referenční gen jsme použili *GAPDH*. Experiment byl dvakrát nezávisle opakován. Zobrazené odchylky znázorňují standardní odchylku měření. Hladinu proteinu erbB-2 v jednotlivých liniích jsme zjišťovali pomocí FACS analýzy (viz níže).

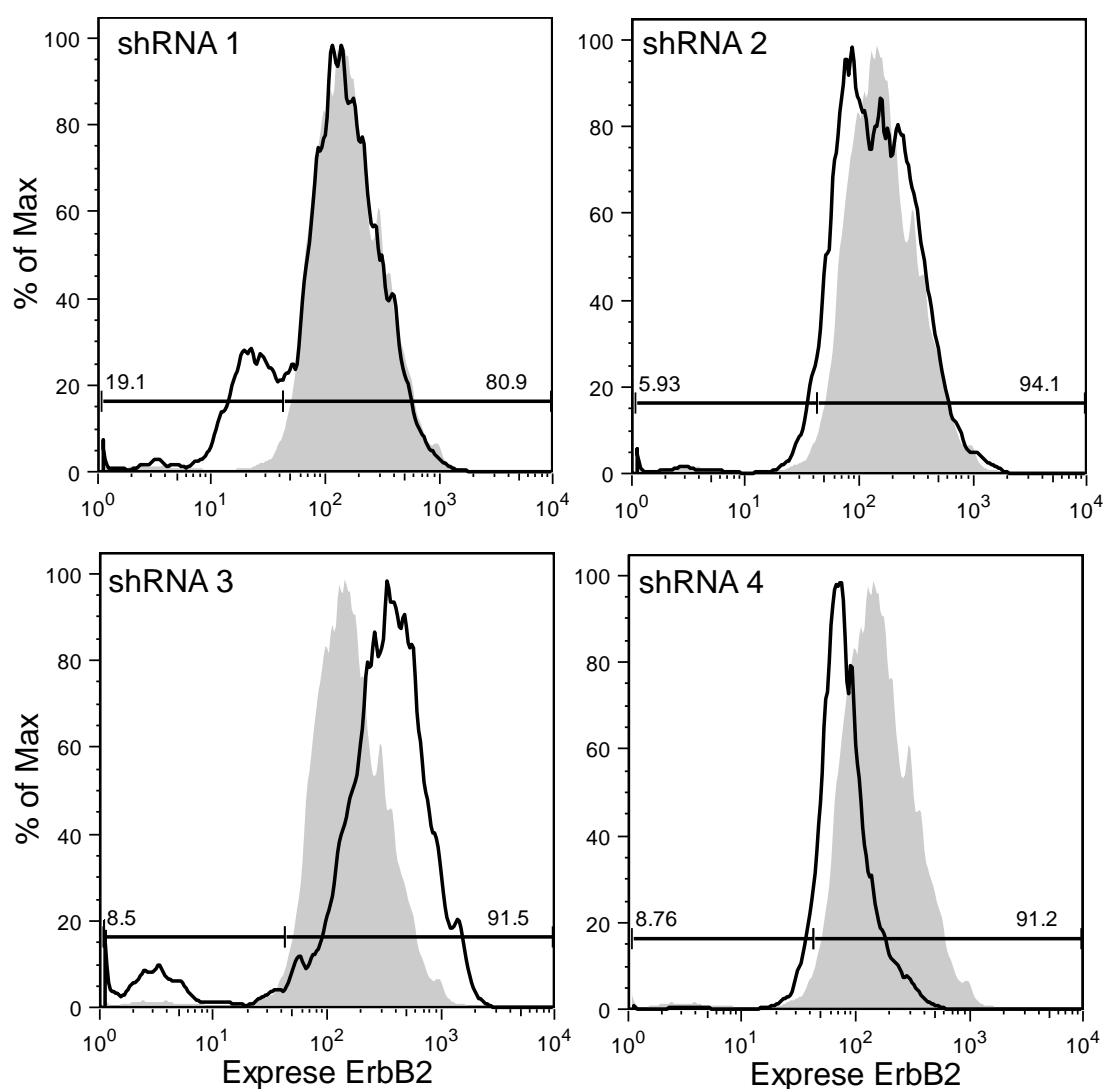
Real-Time PCR analýza buněk MCF7 s vnesenými shRNA plazmidy



Obr 12. Exprese genu *ERBB2* v buňkách MCF7 transfekovaných shRNA plazmidem pro lidský erbB-2. Relativní exprese mRNA pro erbB-2 byla zjišťována ve směsných populacích nesoucích shRNA plazmid 1-4, kontrolní plazmid shRNA NS a v parentálních MCF7 buňkách. Hladina mRNA se u parentálních MCF7 buněk a buněk s kontrolním plazmidem bez shRNA sekvence (NS plazmid) neliší. Buňky nesoucí shRNA plazmid 3 vykazují zvýšení hladiny mRNA pro erbB-2.

FACS analýza linií buněk MCF7 s vnesenými shRNA plazmidy

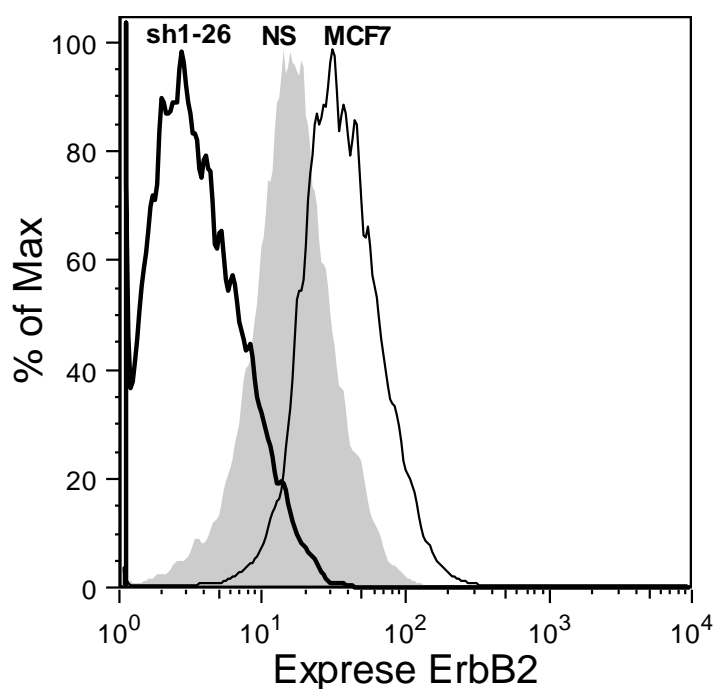
Buňky MCF7 jsme stabilně transfekovali čtyřmi různými shRNA plazmidy pro lidský erbB-2 a kontrolním shRNA NS („non-silencing“) plazmidem. V těchto buňkách jsme testovali úspěšnost shRNA procesu pomocí sledování intenzity fluorescence FL2-H kanálu pomocí FACS. Použili jsme PE-značenou protilátku proti erbB-2. Intenzita fluorescence na kanálu FL2-H je v tomto experimentu přímo úměrná expresi erbB-2. Expresi erbB-2 u shRNA plazmidů 1 - 4 (označeno shRNA 1 - 4) jsme porovnávali s expresí erbB-2 u shRNA NS plazmidu.



Obr. 13. *Expresa proteinu erbB-2 v jednotlivých populacích MCF7 transfekovaných shRNA pro erbB-2. Intenzita fluorescence na kanálu FL2-H pro buňky s kontrolním shRNA NS plazmidem je znázorněna v šedém histogramu. Tento signál je přímo úměrný expresi erbB-2. Expresa erbB-2 v buňkách s NS plazmidem je porovnávána s expresí v ostatních populacích nesoucích jednotlivé shRNA plazmidy 1-4 (znázorněno černým histogramem). Z těchto čtyř shRNA nesoucích populací jsme vybrali buňky nesoucí plazmid 1 pro následnou klonální selekci. Tyto buňky vykazují populaci buněk se sníženou intenzitou fluorescence na FL2-H a tedy sníženou hladinu exprese proteinu erbB-2. Buňky nesoucí shRNA plazmid 3 překvapivě vykazují zvýšení exprese erbB-2 oproti kontrolnímu NS plazmidu.*

Klonální selekce

Ze čtyř plazmidů se sekvencí shRNA pro erbB-2 jsme pro klonální selekci vybrali směšnou populaci buněk nesoucích plazmid 1. Tato populace ukázala na FACS dvě různá maxima, naznačující, že jde o směšnou populaci buněk s umlčeným erbB-2 a buněk, u kterých k umlčení genu nedošlo. ErbB-2⁻ populace tvořila přibližně 20% všech buněk. Buňky nesoucí plazmid 1 byly vysazeny v počtu přibližně 5×10^3 buněk na kultivační misku o průměru 10 cm, tj. koncentrace 500 buněk/ml. Kolonie vzniklé z jedné buňky byly sklizeny a rozsazeny zvlášť do dvou 24 jamkových destiček a poté otestovány na hladinu proteinu pomocí FACS. Vybrali jsme klon s nejnižší hladinou exprese proteinu erbB-2, tj. klon 26. Pro klon 26 jsme naměřili 91,3% buněk se sníženou expresí erbB-2 oproti parentálním MCF7 buňkám a 68,6% buněk se sníženou expresí erbB-2 oproti kontrolním buňkám s NS plazmidem. Klon č. 33 naopak exprimoval erbB-2 na stejné hladině jako kontrolní MCF7 buňky (snížení fluorescence na kanálu FL2-H 1,81%). Tento klon jsme použili jako kontrolu pro analýzu rychlosti proliferace erbB-2 deficientního klonu č. 26.



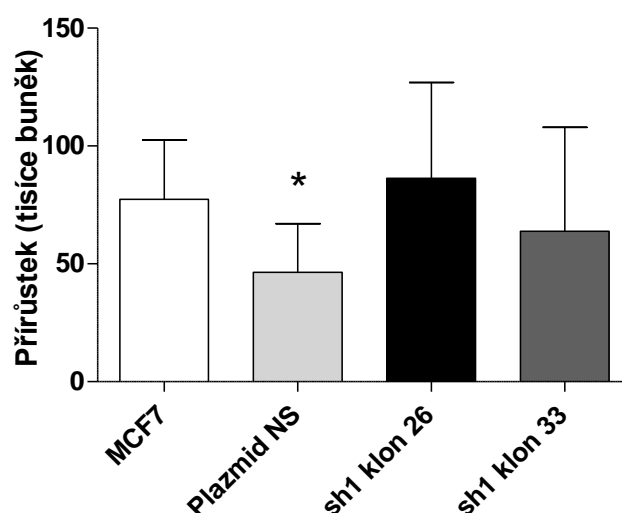
Obr. 14. *Expresse proteinu erbB-2 u erbB-2⁻ klonu získaného po klonální selekci (silný černý histogram). V šedém plném histogramu jsou znázorněny buňky s NS kontrolním plazmidem, slabou černou linkou je znázorněn histogram pro parentální MCF7 buňky. Histogram je reprezentativním vzorkem z 2 nezávislých experimentů.*

	Geometrický průměr intenzity kanálu FL2-H
sh1 klon 16	4,31
sh1 klon 26	3,3
sh1 klon 28	3,68
sh1 klon 33	39,9
sh1 klon 38	31,8
sh1 klon 42	4,04
NS	15,8
MCF7	35,5

Tabulka 2. Geometrický průměr intenzity fluorescence na kanálu FL2-H v jednotlivých klonech buněk s shRNA plazmidem 1. Tento signál je přímo úměrný expresi *erbB-2*. Klon č. 26 vykazuje přibližně desetkrát snížení exprese *erbB-2* oproti parentálním MCF7 buňkám a pětkrát snížení oproti kontrolním buňkám s NS plazmidem. Tabulka je reprezentativním vzorkem ze 2 nezávislých experimentů.

Analýza proliferace vyselektovaných klonů s shRNA plazmidem 1

Při kultivaci buněk s shRNA plazmidem 1 klonu 26 a buněk s NS plazmidem jsme pozorovali rozdíly v rychlosti proliferace. Parentální MCF7 buňky, buňky s NS plazmidem, buňky klonu č. 26 a buňky klonu č. 33 jsme vysadili v množství 1×10^5 buněk na 1 jamku v 6ti-jamkové destičce, po 24 hodinách kultivace sklídili, obarvili trypanovou modří a živé buňky spočítali v Bürkerově komůrce. Experiment jsme šestkrát opakovali. Výsledky ukazují, že buňky s plazmidem NS se dělí pomaleji než kontrolní MCF7 buňky i než buňky obou klonů. Naproti tomu, buňky klonu č. 26 se sníženou hladinou proteinu *erbB-2* rostou rychleji než kontrolní MCF7 i než buňky s NS plazmidem (Obr. 15).



Obr. 15. Proliferace linií s vneseným shRNA plazmidem.

Graf ukazuje přírůstek buněk v jednotlivých liniích po 24 hodinové inkubaci. Buňky s kontrolním NS shRNA plazmidem rostou signifikantně pomaleji než parentální MCF7 buňky. Uvedené hodnoty byly naměřeny v šesti nezávislých opakováních a jsou statisticky vyhodnoceny *t*-testem, odchylky ukazují standardní chybu průměru.

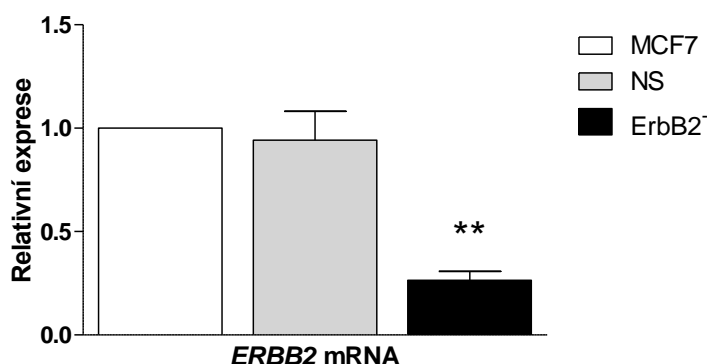
Schopnost MCF7 buněk se sníženou expresí erbB-2 vytvářet mammosféry

Pro zjištění schopnosti vytvářet mammosféry u linie buněk MCF7 se sníženou expresí erbB-2 (shRNA plazmid 1, klon 26) a u kontrolních buněk nesoucích NS shRNA plazmid, jsme tyto buňky převedli do MS média. Použili jsme stejný postup, jako pro mammosféry z parentální populace MCF7 buněk. ErbB-2-deficientní buňky i buňky nesoucí NS shRNA plazmid vytvářely mammosféry. Tyto sféry byly vzhledově nerozeznatelné od mammosfér vytvořených z parentálních MCF7 buněk.

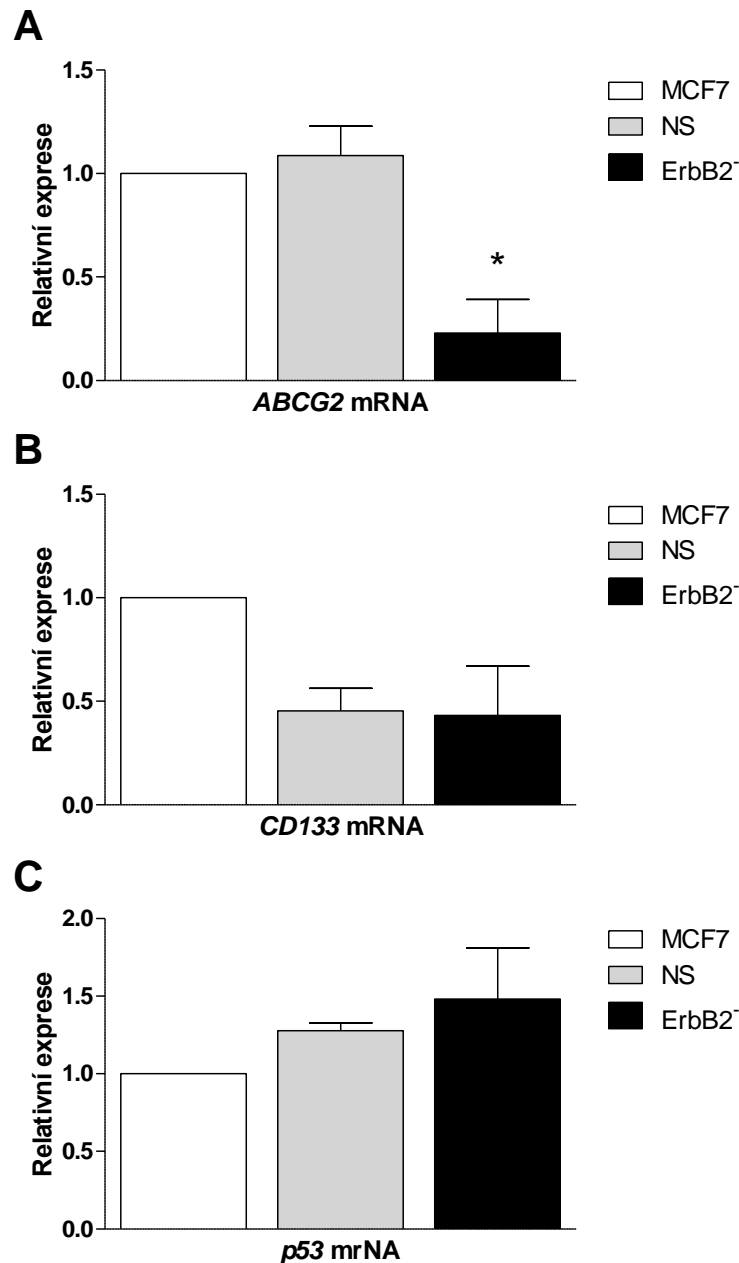
Expresse vybraných genů u MCF7 buněk se sníženou expresí erbB-2

Genovou expresi v linii buněk se sníženým erbB-2 (shRNA plazmid 1, klon č. 26) jsme porovnávali s expresním profilem parentálních MCF7 buněk a buněk s shRNA NS plazmidem pomocí Real-Time PCR analýzy.

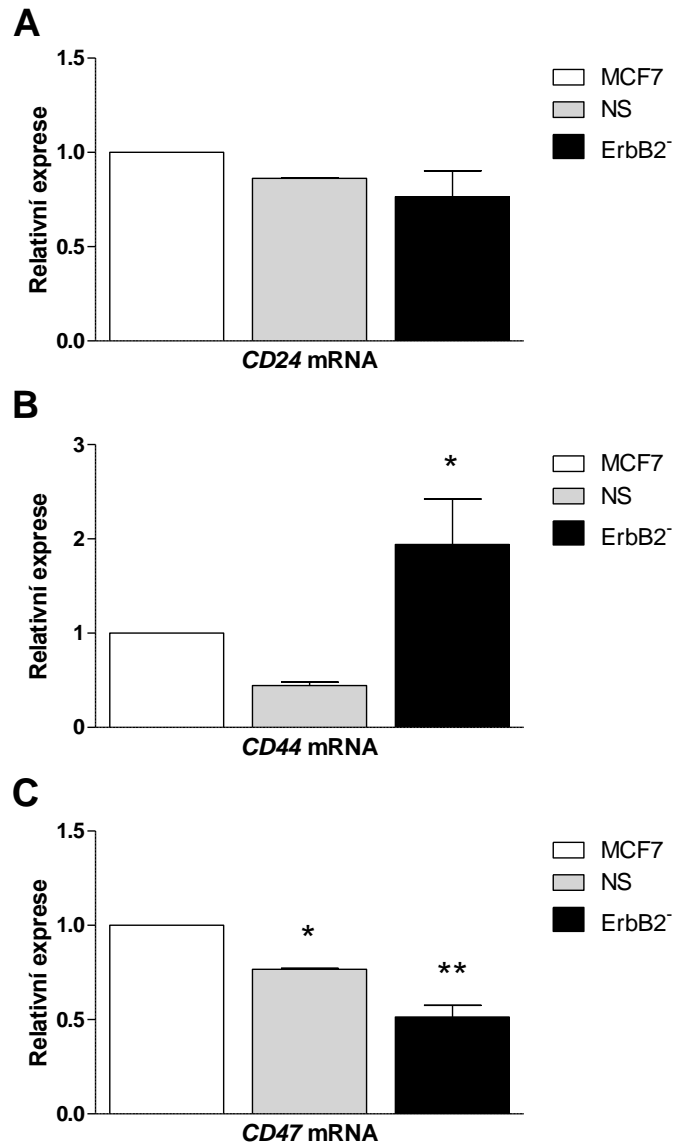
V experimentu jsme sledovali hladiny mRNA pro geny *ERBB2* (Obr. 16.); *ABCG-2*, *CD133*, *p53* (Obr. 17.); *CD24*, *CD44*, *CD47* (Obr. 18); *OCT4*, *Vimentin* a *SOX2* (Obr. 19.). Real-Time PCR analýza byla provedena v duplikátech a vyhodnocena pomocí $\Delta\Delta\text{Ct}$ metody, jako referenční gen jsme použili *GAPDH*. Experiment byl dvakrát opakován a statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí testu one-way ANOVA. Zobrazené odchylky znázorňují standardní odchylku měření.



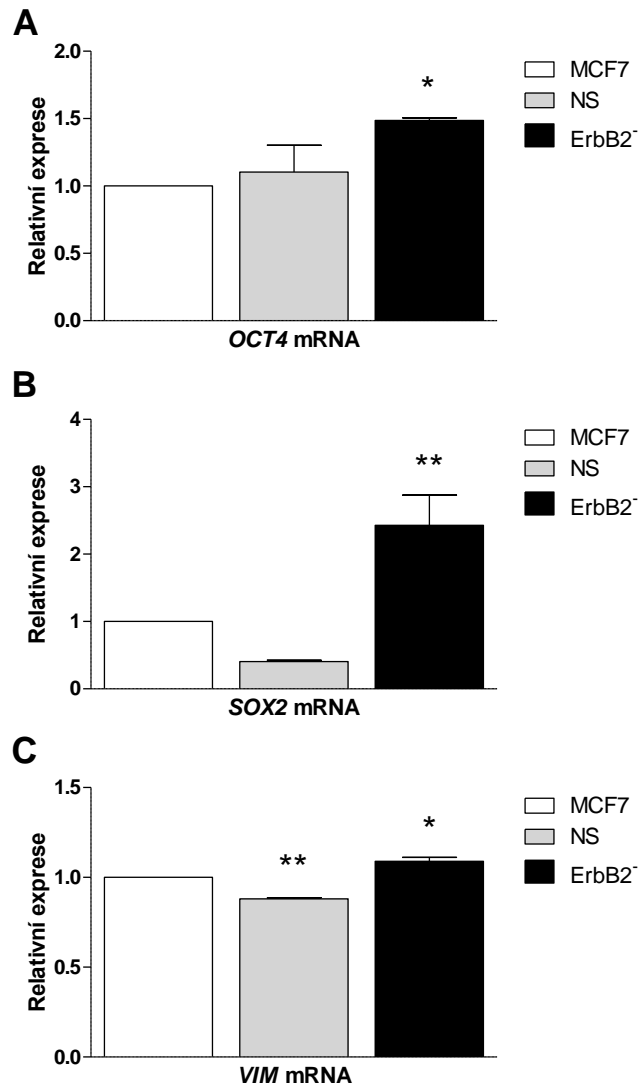
Obr. 16. *Expresse genu ERBB2 v parentálních populacích MCF7, linie s NS shRNA plazmidem a erbB-2 linie. Graf ukazuje vysoce signifikantní snížení hladiny mRNA pro erbB-2 u erbB-2 linie buněk MCF7 v porovnání s MCF7 buňkami i s buňkami nesoucími shRNA NS plazmid ($p < 0,01$). Buňky s NS plazmidem exprimují gen pro erbB-2 relativně stejně jako MCF7 parentální buňky. Statistické vyhodnocení bylo provedeno one-way ANOVA testem*



Obr. 17. Expresa genů ABCG-2, CD133 a p53 v parentálních populacích MCF7, linie s shRNA plazmidem NS a erbB-2⁻ linie detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro gen ABCG-2 je v erbB-2⁻ buňkách signifikantně snížena v porovnání s MCF7 buňkami i s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid ($p < 0,05$). (B, C) Hladina exprese mRNA pro geny CD133 a p53 není v erbB-2⁻ buňkách signifikantně změněna v porovnání s MCF7 buňkami ani s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid. Statistické vyhodnocení bylo provedeno one-way ANOVA následovanou Tukey testem.



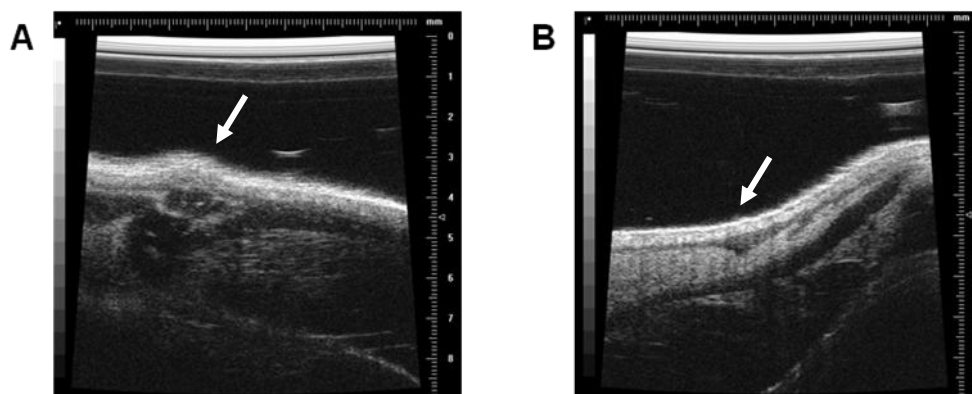
Obr. 18. Expresa genů CD24, CD44 a CD47 v parentálních populacích MCF7, linie s plazmidem NS a erbB-2⁻ linie detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro gen CD24 není v erbB-2⁻ buňkách signifikantně změněna v porovnání s MCF7 buňkami ani s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid. (B) Hladina exprese mRNA pro gen CD44 je v erbB-2⁻ buňkách signifikantně zvýšena v porovnání s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid ($p < 0,05$). (C) Hladina exprese mRNA pro gen CD47 je v erbB-2⁻ buňkách vysoce signifikantně snížena v porovnání s MCF7 buňkami ($p < 0,01$) a signifikantně snížena v porovnání s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid ($p < 0,05$). Dále je signifikantně snížena hladina exprese mRNA pro CD47 v buňkách nesoucích shRNA NS plazmid oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení bylo provedeno one-way ANOVA následovanou Tukey testem.



Obr. 19. *Expresa genů OCT4, SOX2 a Vimentin v parentálních populacích MCF7, linie s plazmidem NS a erbB-2⁺ linie detekovaná pomocí qPCR. (A) Hladina exprese mRNA pro gen OCT4 je v erbB-2⁺ buňkách signifikantně zvýšena v porovnání s MCF7 buňkami ($p < 0,05$). (B) Hladina exprese mRNA pro gen Sox-2 je v erbB-2⁺ buňkách signifikantně zvýšena v porovnání s MCF7 buňkami ($p < 0,05$) a vysoce signifikantně zvýšena v porovnání s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid ($p < 0,01$). (C) Hladina exprese mRNA pro gen Vimentin je v erbB-2⁺ buňkách signifikantně zvýšena v porovnání s MCF7 buňkami ($p < 0,05$) a vysoce signifikantně zvýšena v porovnání s buňkami nesoucími NS shRNA plazmid ($p < 0,01$). Dále je vysoce signifikantně snížena hladina mRNA pro Vimentin u buněk s NS plazmidem v porovnání s MCF7 buňkami ($p < 0,01$). Statistické vyhodnocení bylo provedeno one-way ANOVA následovanou Tukey testem.*

5. 4. Schopnost buněk vytvářet nádory v nahé BALB/c nu-nu myši

Po vpravení 3×10^6 buněk ve 100 μ l PBS na myš jsme další den pozorovali v některých místech vpichu malé hrbolky. Tyto útvary byly pravděpodobně tvořeny dosud nevstřebanou tekutinou s buňkami a podle očekávání se do týdne všechny vstřebaly. Po třech týdnech od vpichu buněk jsme na myši číslo 4 zjistili hmatatelný nádor nad levým stehenním svaem. Tato strana odpovídá erbB-2-deficientní linii MCF7 buněk. Na pravé straně ve stejnou dobu žádný hmatatelný nádor nebyl znatelný. Ostatní myši nemají v současné době žádné hmatatelné nádory. Nádor na myši č. 4 byl zobrazen pomocí ultrazvukového zařízení. Pomocí specifického softwaru byl objem nádoru stanoven na 0,82 mm³, což odpovídá velmi ranému stádiu nádorového bujení.



Obr. 20. Ultrazvukové zobrazení nádoru vytvořeného erbB-2-deficientními buňkami MCF7 linie. (A) Obrázek znázorňuje místo nad levým stehenním svaem myši číslo 4. Nádor vznikl po třech týdnech od subkutánního vpravení 3×10^6 buněk erbB-2-deficientní linie MCF. Objem nádoru byl vyhodnocen jako 0,82 mm³. (B) Druhý obrázek znázorňuje místo nad pravým stehenním svaem téže myši, ve kterém jsou vpraveny kontrolní buňky nesoucí NS shRNA plazmid. Tyto buňky při stejných podmínkách nádor dosud nevytvořily.

6. Diskuze

Kultivace mammosfér jako modelu RKB se zdá být v současné době jednou z preferovaných metod pro studium této frakce buněk. Výsledky pozorované *in vitro* je nicméně vždy nutné potvrdit pomocí *in vivo* studií, zejména za použití experimentálních myších modelů.

Nedávné výzkumy naznačují, že zvýšená exprese onkogenu erbB-2 by mohla mít vliv na kmenové vlastnosti frakce RKB. Zvýšená exprese onkogenu erbB-2 je spojována s vyšší tumorigenicitou, invazivitou a zvýšením procenta populace RKB v nádorech prsu (Arrington et al, 2009; Korkaya et al, 2008; Magnifico et al, 2009). Dá se tedy předpokládat, že se erbB-2 podílí na udržování kmenových vlastností RKB a může mít vliv i v procesu tvorby kmenového fenotypu této frakce. Tato problematika je vysoce relevantní zvláště v souvislosti s vysokou mírou rezistence k léčivům cíleným na erbB-2. V této práci jsme se zaměřili na sledování změn vlastností spojených s iniciací nádorů a kmenovostí, které v nádorových buňkách nastanou při snížení exprese erbB-2. Pro tyto účely jsme zavedli kultivaci mammosfér z MCF7 buněk rakoviny prsu. Dále jsme připravili linii MCF7 buněk se sníženou expresí erbB-2 a testujeme, zda je v těchto buňkách změněná schopnost iniciovat tvorbu nádoru po přenosu do BALB/c *nu-nu* myši.

6. 1. Kultivace mammosfér

Metodu kultivace RKB v podobě mammosfér jsme zavedli na základě upraveného protokolu popsaného autory Dontu et al (2003) a podle protokolu na pěstování neurosfér z Queensland Brain Institute (informace poskytl Prof. B.A. Reynolds). V našem protokolu jsme používali běžné plastové kultivační lahve, nikoliv materiál vyznačující se sníženou adhezivitou buněk, který je používán v mnoha studiích. Dále jsme adherentní buňky linií MCF7 a MDA-MB-453 převáděli do mammosférového média postupně v pěti pasážích (tzv. „weaning“), ve kterých jsme měnili poměr původního DMEM k MS médiu (viz. Obr. 4). Tento postup se nám osvědčil více než výměna DMEM za MS médium v jednom kroku. Buňky byly po postupném převodu

životaschopnější a tvořily větší mammosféry. Při převodu do bezsérového média ve více krocích mají buňky možnost postupně změnit genovou expresi a vyhnou se tak masivní aktivaci stresových drah.

Při převádění buněk do mammosfér jsme během prvních dvou pasáží (fáze DMEM:MS 3:1 a 1:1) pozorovali zrychlenou proliferaci oproti kontrolním parentálním buňkám, což je pravděpodobně dáno dodatkem růstových faktorů EGF a FGF2 a Proliferation supplement v MS médiu. Naopak přechod do fáze, ve které buňky mají pouze 25% DMEM a 75% MS média byl velmi často spojen s vymřením velké části populace. V této fázi se již objevovaly první sféry. Ve stoprocentním MS médiu jsme buňky kultivovali po dobu tří pasáží. Při vyšším počtu pasáží mammosfér (5 a více) jsme pozorovali zmenšování suspenzních kolonií a sníženou rychlost růstu. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky Dey et al (2009), kteří popsali, že po páté pasáži mammosfér dochází ke zvýšení aktivity enzymu β -galaktosidázy, což je znakem zahájení procesu senescence.

Z obou použitých nádorových linií rakoviny prsu se nám podařilo vypěstovat suspenzní sférické kolonie. Tyto kolonie vykazovaly silně změněný fenotyp oproti parentálním adherentním buňkám (Obr. 6). Sféry z MDA-MB-453 linie však zůstávaly více v podobě hroznů buněk, zatímco MCF7 sféry byly tvořeny kompaktní kolonií, kterou bylo poměrně složité disociovat. Z toho usuzujeme, že na rozdíl od mammosfér MCF7 linie, linie buněk MDA-MB-453 buď klasické mammosféry netvoří, nebo by tyto buňky vyžadovaly jiné kultivační podmínky.

6. 2. Charakterizace genové exprese v průběhu utváření mammosfér

MCF7 buňky

U MCF7 buněk jsme sledovali změny expresního profilu v průběhu utváření mammosfér. Vzorky odpovídaly každé z pasáží lišící se poměrem DMEM:MS médiu, mammosféry jsme pěstovali do třetí pasáže. Výsledky jsou ze tří nezávislých qPCR experimentů. Statistickou analýzou jsme porovnávali změny hladiny exprese mRNA ve všech pasážích převodu adherentních buněk MCF7 do mammosfér oproti

hladině v parentálních MCF7 buňkách. Toto vyhodnocení jsme provedli testem one-way ANOVA ve spojení s Dunettovým testem, který porovnává vzorky vůči kontrole. Statisticky významné změny hladiny exprese mRNA se ukázaly až ve třetí mammosférové pasáži. Poměrně značné odchylky (SD), které jsou v tomto experimentu, jsou dány zvláště biologickou variabilitou našeho modelu. Zjistili jsme, že hladina exprese mRNA pro jednotlivé sledované geny se značně mění v návaznosti na době sklizení buněk, tedy na přesném časovém úseku po který buňky zůstávají v jednotlivých pasážích během převodu do MS média. Proto, ačkoliv jednotlivé qPCR experimenty vykazovaly odchylky mnohem menší, po spojení a statistickém vyhodnocení se projevila různá hladina exprese mRNA v jednotlivých experimentech jako standardní odchylka měření. Pro všechny geny jsme proto provedli i analýzu lineárního růstového trendu, který vyhodnocuje zda pozorovatelné zvyšování exprese v průběhu „weaningu“ je statisticky signifikantní a není dáno pouze variabilitou naměřených hodnot.

- Hladina exprese mRNA pro geny *ERBB2*, *CD24*, *CD44* a *Vimentin* byla vysoce signifikantně zvýšená v mammosférách po třetí pasáži oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,01$) a vykazuje signifikantní lineární růstový trend ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *ABCG-2* byla signifikantně zvýšená v mammosférách po třetí pasáži oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$) a vykazuje signifikantní lineární růstový trend ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro geny *CD47* a *SOX2* vykazuje signifikantní lineární růstový trend ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro geny *CD133*, *p53* a *OCT4* nebyla signifikantně změněna podle Dunettova testu, ani nevykázala signifikantní růstový trend.

Zvýšená exprese CD44 je považována za znak charakteristický pro populace RKB rakoviny prsu (Al-Hajj et al, 2003), pankreatu (Li et al, 2007), prostaty (Collins et al, 2005) a tlustého střeva (Dalerba et al, 2007). Mimo jiné je známo, že intracelulární doména tohoto proteinu interaguje s erbB-2 receptorem a CD44 se tak účastní signálních drah vedoucích ke zvýšené kmenovosti a rezistenci buněk. Zvýšená exprese erbB-2 v mammosférách odpovídá hypotéze, která zvýšenou expresi tohoto receptoru považuje za marker RKB populace rakoviny prsu. Je tudíž možné, že zvýšená exprese tohoto onkogenu vede k aktivaci dalších drah spojených

s onkogenezí. Zvýšenému kmenovému charakteru těchto buněk odpovídá i zvýšená exprese ABCG-2, který buňkám dává vyšší rezistenci k apoptóze (Nakanishi et al, 2010). Zvýšená exprese Vimentinu ukazuje na změnu fenotypu buněk z epitelálních v mezenchymální, což je spojeno s vyšší schopností migrovat. Překvapivá je vysoká hladina CD24 v mammosférách v porovnání s parentálními MCF7 buňkami. Přesto, že RKB rakoviny prsu byly původně Al-Hajjem et al (2003) definovány jako CD24⁻, je dnes již evidentní, že CD24⁻ populace RKB je spojena pouze s některými typy nádorů prsu a CD24⁺ buňky pravděpodobně vykazují zvýšený metastatický potenciál (Honeth et al, 2008; Pece et al, 2010). Zvýšení metastatického potenciálu se dá očekávat i od exprese CD47, která vykazuje lineární růst ve směru k mammosférám. Exprese tohoto genu zároveň chrání buňky před „útokem“ imunitního systému (Jaiswal et al, 2009). Lineární růstový trend, který vykazuje SOX-2, odpovídá postupnému zvyšování kmenovosti těchto buněk.

Marker *CD133* vykazoval v průběhu utváření mammosfér dvě maxima, a to první ve fázi se 75% MS a 25% DMEM média, tedy v poslední pasáži před vytvořením mammosfér, a druhé ve třetí pasáži mammosfér. Hladina exprese CD133 se však mezi experimenty silně lišila, proto změny v expresi tohoto genu nebyly statisticky signifikantní. Podobně marker kmenových buněk *OCT4* vykazoval ve dvou ze tří pokusů nárůst exprese v mammosférách, nicméně v důsledku variability mezi experimenty tyto změny nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Je tedy možné předpokládat, že při větším počtu opakování bychom došli k signifikantním změnám v expresi těchto dvou genů.

Z těchto výsledků usuzujeme, že námi vypěstované mammosféry MCF7 buněk po třetí pasáži vykazují zvýšené kmenové vlastnosti a jsou vhodné jako *in vitro* model RKB.

MDA-MB-453 buňky

U MDA-MB-453 buněk jsme porovnávali expresi vybraných genů v mammosférách po druhé pasáži oproti parentálním buňkám. Výsledky jsou ze tří nezávislých qPCR analýz a jsou statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu.

- Hladina exprese mRNA pro gen *CD133* byla extrémně signifikantně snížena v mammosférách po druhé pasáži oproti parentálním MDA-MB-453 buňkám ($p < 0,001$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *CD44* byla signifikantně snížena v mammosférách po druhé pasáži oproti parentálním MDA-MB-453 buňkám ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *CD24* byla signifikantně zvýšená v mammosférách po druhé pasáži oproti parentálním MDA-MB-453 buňkám ($p < 0,05$).
- Změny hladin exprese mRNA pro geny *ABCG-2*, *p53*, *CD47*, *erbB-2*, *OCT4* ani *SOX2* nebyly v tomto experimentu vyhodnoceny jako signifikantní.

Mammosféry v MDA-MB-453 linii tedy nevykazují zvýšení žádného ze sledovaných genů se známou účastí na kmenových vlastnostech RKB. Přihlédneme-li i k faktu, že vzhledově kolonie MDA-MB-453 vytvářely spíše hrozny buněk než kompaktní sféry (Obr. 6), můžeme usuzovat, že MDA-MB-453 linie buď mammosféry jakožto RKB nevytváří nebo by u této linie byla nutná úprava podmínek kultivace. Z těchto důvodů jsme MDA-MB-453 buňky v dalších experimentech nepoužívali. Nicméně by bylo zajímavé zjistit, jestli tyto popsané vlastnosti sfér vytvořených z MDA-MB-453 buněk souvisí se zvýšenou hladinou *erbB-2* parentální populace, která je u těchto buněk známá (Neve et al, 2006).

6. 3. Role onkogenu *erbB-2* v RKB

Příprava linie MCF7 buněk se sníženou expresí *erbB-2*

Pro studium role onkogenu *erbB-2* v kontextu RKB jsme vytvořili stabilní linii MCF7 buněk transfekovanou shRNA plazmidem proti lidskému *erbB-2*. Účinnost shRNA procesu jsme ověřili pomocí Real-Time PCR na hladině genové exprese mRNA pro *erbB-2* a dále pomocí FACS analýzy na hladině exprese proteinu *erbB-2*.

Pomocí qPCR jsme zjistili, že ve směsných populacích buněk nesoucích jednotlivé shRNA plazmidy, ze čtyř shRNA plazmidů, které jsme měli k dispozici, tři plazmidy snižují expresi mRNA pro *erbB-2* (plazmidy 1, 2 a 4), plazmid č. 3 však expresi

mRNA pro erbB-2 zvyšoval oproti MCF7 buňkám i buňkám nesoucím plazmid s NS shRNA. Vzhledem k tomu, že zvýšení exprese erbB-2 v buňkách s plazmidem 3 jsme pozorovali i na úrovni proteinu, jde pravděpodobně o vedlejší efekt nesprávně vloženého shRNA konstruktů.

FACS analýza jednotlivých populací MCF7 buněk nesoucích shRNA plazmidy 1-4 a NS plazmid odhalila v buňkách nesoucích shRNA plazmid 1 dvě populace lišící se expresí erbB-2. To znamená, že se jedná o směsnou populaci buněk s umlčenou expresí erbB-2 a buněk, u kterých k umlčení tohoto genu nedošlo. Z toho důvodu jsme se rozhodli provést u těchto buněk klonální selekci. Buňky jsme vysadili na kultivační misku ve velmi malé koncentraci (5×10^2 buněk/ml) a nechali narůst klony pocházející z jednotlivých buněk. Tyto klony jsme poté nasadili zvlášť do dvou 24-jamkových destiček a po napěstování otestovali jejich hladinu exprese proteinu erbB-2. Buňky směsné populace nesoucí shRNA plazmid 1, které vykazovaly snížení hladiny erbB-2, tvořily asi 20% celkové buněčné populace. Z toho plyne, že obdobně 20% námi vyselektovaných klonů by mělo mít sníženou expresi erbB-2. Klony buněk nesoucí shRNA plazmid 1 jsme otestovali na hladinu exprese proteinu erbB-2 pomocí FACS analýzy a vybrali klon, který vykazoval nejnižší hladinu exprese tohoto proteinu. Tento klon (klon č. 26) vykazoval přibližně 10-ti násobné snížení exprese erbB-2 oproti parentálním MCF7 buňkám.

Analýza exprese erbB-2 v buňkách nesoucí kontrolní shRNA NS plazmid však ukázala, že tyto buňky mají hladinu exprese erbB-2 přibližně 2,2 x sníženu oproti parentálním MCF7 buňkám. Důvodem je pravděpodobně fakt, že jde o směsnou populaci, ve které část buněk vykazuje snížení exprese erbB-2 jako vedlejší důsledek nesprávné inkorporace vneseného shRNA NS plazmidu. Klon č. 26, vybraný jako klon s nejnižší expresí erbB-2, vykazuje snížení exprese přibližně 5 x oproti buňkám s NS plazmidem. Pro budoucí experimenty se proto pokusíme získat buňky MCF7 nesoucí kontrolní shRNA NS plazmid, které nebudou vykazovat snížení v erbB-2 na proteinové úrovni.

Při další kultivaci jsme mezi buňkami s NS plazmidem, MCF7 buňkami a buňkami erbB-2-deficientního klonu pozorovali i rozdíl v rychlosti proliferace. Zjistili jsme, že buňky nesoucí NS shRNA plazmid rostou signifikantně pomaleji než parentální MCF7 buňky ($p < 0,05$). Rozdíl v rychlosti růstu mezi buňkami s NS plazmidem a

erbB-2-deficientními buňkami signifikantní nebyl. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu.

Jako výsledek těchto pokusů jsme tedy získali linii MCF7 buněk se sníženou hladinou exprese erbB-2 a to na úrovni mRNA i proteinu.

Kvantitativní Real-Time PCR analýza exprese vybraných genů erbB-2-deficientní linie MCF7 buněk

Expresi genů v erbB-2-deficientní linii MCF7 buněk jsme porovnávali s expresním profilem buněk nesoucích NS shRNA plazmid a parentálních MCF7 buněk. Výsledky, představující dvě qPCR analýzy, byly statisticky vyhodnoceny pomocí one-way ANOVA následované Tukey testem.

- Hladina exprese mRNA pro gen *ERBB2* byla vysoce signifikantně zvýšená v erbB-2-deficientní linii oproti parentálním MCF7 buňkám i oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid ($p < 0,01$).

Z tohoto kontrolního experimentu plyne, že naše erbB-2-deficientní linie vykazuje snížení exprese pro erbB-2 i na úrovni mRNA.

- Hladina exprese mRNA pro gen *CD47* byla vysoce signifikantně snížena v erbB-2-deficientní linii oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,01$) a signifikantně snížena oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid ($p < 0,05$).
- Hladina exprese pro gen kódující Vimentin byla signifikantně zvýšená v erbB-2-deficientní linii oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$) a vysoce signifikantně zvýšena oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid ($p < 0,01$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *ABCG-2* byla signifikantně snížena oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid i oproti MCF7 buňkám ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *SOX2* byla signifikantně zvýšená v erbB-2-deficientní linii oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$) a vysoce signifikantně zvýšená oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid ($p < 0,01$).

Z těchto výsledků můžeme konstatovat, že při absenci erbB-2 v MCF7 buňkách klesá exprese ABCG-2 a CD47 a naopak stoupá exprese Sox-2 a Vimentinu.

- Hladina exprese mRNA pro gen *CD44* byla signifikantně zvýšená v erbB-2-deficientní linii oproti buňkám nesoucím NS shRNA plazmid ($p < 0,05$).
- Hladina exprese mRNA pro gen *OCT4* byla signifikantně zvýšená v erbB-2-deficientní linii oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,05$).

Pro tyto dva geny nelze prozatím vynést jednoznačný závěr, protože ke změnám exprese u erbB-2-deficientní linie nedošlo v porovnání s oběma kontrolními liniemi a bude třeba dalších opakování.

- Hladina exprese mRNA pro geny *CD47* a *Vimentin* byla navíc signifikantně snížena u buněk nesoucích NS shRNA plazmid oproti parentálním MCF7 buňkám ($p < 0,01$, resp. $p < 0,05$).
- Změny hladin exprese mRNA pro geny *CD133*, *p53* a *CD24* nebyly v tomto experimentu vyhodnoceny jako signifikantní.

Kontrolní buňky nesoucí NS shRNA plazmid vykazují signifikantní snížení genů *CD47* a *Vimentin* oproti parentálním MCF7 buňkám. Z toho lze usoudit, že v případě dalšího studia těchto dvou genů, by tyto buňky nebyly vhodnou kontrolou. V našich experimentech se však budeme soustředit zvláště na erbB-2 a proto, i když s určitými výhradami, můžeme buňky nesoucí NS shRNA plazmid použít jako kontrolní buňky. Pro další pokračování experimentů však bude nutné vytvořit linii MCF7 buněk nesoucí NS shRNA plazmid, která však nebude vykazovat vedlejší efekty. Z toho důvodu provedeme klonální selekci i pro směsnou populaci nesoucí NS shRNA plazmid, obdobně, jako jsme selektovali buňky se sníženou expresí erbB-2.

Tímto experimentem jsme získali představu o změnách v expresním profilu některých markerů kmenovosti při snížení exprese erbB-2. Tyto změny však zatím jednoznačně neurčují, zda erbB-2-deficientní MCF7 buňky mají změněné vlastnosti spojené s tumorigenicitou. Tento experiment bude nutné opakovat. Dále bude zajímavé zjistit, jak se expresní profil této erbB-2-deficientní linie bude měnit

v mammosférách. V předběžných pokusech jsme zjistili, že tyto buňky jsou schopné mammosféry vytvářet, přičemž vzhledově jsou tyto sféry nerozeznatelné od sfér vytvořených z parentálních MCF7 buněk. Z tohoto pozorování plyne, že exprese erbB-2 velmi pravděpodobně není nezbytná pro vytváření mammosfér. Nicméně zatím není jisté, zda-li tyto sféry budou vykazovat kmenový charakter RKB.

6. 4. Xenotransplantace

Úspěšná xenotransplantace nádoru do imunosuprimované myši je považována za zlatý standard průkazu populace RKB (Clarke et al, 2006). Nicméně je známo, že úspěšnost takového přenosu je mnohem menší, než při syngenních transplantacích (Kelly et al, 2007). Zásadní roli v této otázce hraje rozdílné mikroprostředí, které je charakterizováno hladinou určitých cytokinů a růstových faktorů a dalších složek, jež nejsou zcela kompatibilní mezi lidskými buňkami a myšími modely. Některé myší faktory, např. epidermální růstový faktor a fibroblastový růstový faktor jsou ale schopné interagovat i s lidskými ekvivalenty (Visvader and Lindeman, 2008). Zdá se tedy, že i přes jisté limitace je xenotransplantace velmi dobrou funkční analýzou RKB *in vivo*. V našich experimentech jsme kontrolní i ovlivněné buňky vnašeli do jedné myši (nad levý a pravý stehenní sval), čímž jsme minimalizovali rozdíly vzniklé při použití dvou různých myších příjemců. Dále jsme používali BALB/c *nu-nu* myši s vyšší zbytkovou hladinou imunity, než mají běžně používané NOD/SCID myší modely.

Do čtyř BALB/c *nu-nu* myších samic jsme subkutánně vpravili 3×10^6 buněk ve 100 μ l PBS. Nad levý stehenní sval jsme vždy vnesli erbB-2-deficientní buňky, nad pravý stehenní sval kontrolní buňky nesoucí shRNA NS plazmid. V době odevzdání této práce jsou buňky vpravené do myši již třetí týden. Zatím se objevil pouze jeden hmatatelný nádor a to v místě vpichu erbB-2-deficientní linie. Kontrolní buňky nesoucí NS shRNA plazmid v této myši zatím nádor nevytvořily. Nádor odvozený od erbB-2-deficientní linie je v současné době velký přibližně $0,82 \text{ mm}^3$, což odpovídá velmi ranému stádiu nádorového bujení. Ostatní myši zatím nemají žádné hmatatelné nádory a vyhodnocení pokusu bude tudíž možné až po analýze ostatních myší, pokud na nich nádory vyrostou

Pro potenciálně očekávaný zpomalený růst nádorů odvozených od buněk nesoucích erbB-2 shRNA plazmid existuje několik možných vysvětlení. Může jít o efekt snížené exprese onkogenu erbB-2 a tedy nižší stimulaci onkogenních signálních drah, které jsou s erbB-2 spojené. Nicméně toto zdůvodnění není v současné fázi relevantní, neboť erbB-2-deficientní buňky jsou jediné, které dosud nádor vytvořily. To by však bylo v rozporu s výsledky Korkaya et al (2008), kteří ukázali, že buňky se sníženou expresí erbB-2 obsahovaly přibližně 4-násobně menší populaci ALDH⁺ buněk, které byly v pokusu používány pro identifikaci RKB frakce. Tyto experimenty však byly provedeny na nádorové línii HCC1954, která na rozdíl od MCF7 linie vykazuje zvýšenou expresi onkogenu erbB-2. Arrington et al (2009) nedávno ukázali, že snížení exprese erbB-2 pomocí shRNA má negativní účinek na životaschopnost buněk a schopnost vytvořit nádory, ale pouze u linií, které mají zvýšenou expresi erbB-2. V liniích bez zvýšené exprese erbB-2 však tyto účinky nepozorovali.

Zpomalený růst nádorů bychom pozorovali i v případě příliš malé dávky buněk. Zpoždění možnosti detekce nádorů by také připadalo v úvahu v případě, kdy by buňky byly vpíchnuty příliš hluboko pod kůži nebo do místa, kde není dostatek svalové hmoty, která nádor udrží. Vznikající nádor by se propadal do břišní dutiny, kde by ho nebylo možné snadno zjistit. Pokud nádory nevyrostou ani po delší době, bude pro příští experiment nutné použít větší množství buněk. Pokud nevyrostou kontrolní nádory nesoucí shRNA NS plazmid, budeme muset pro příští experimenty použít takové kontrolní buňky, které nebudou vykazovat snížení erbB-2 oproti parentálním MCF7 buňkám, například pomocí selekce klonů z této směsné populace. V těchto pokusech budeme pokračovat během nadcházejícího období, kdy bychom měli být ve stadiu umožňujícím analýzu předběžných dat, které přejde v navrzení hypotézy definující roli onkogenu erbB-2 při tvorbě nádorů v imunosuprimovaných myších.

7. Závěr a perspektivy

Teorie rakovinných kmenových buněk patří mezi nejvíce diskutovaná témata nádorové biologie poslední doby. Vzhledem k vyšší odolnosti RKB k tradiční protirakovinné léčbě (Li et al, 2008), představuje toto nové pojetí nádoru, jakožto souboru buněk s jistou hierarchií, výzvu k přehodnocení dosavadních terapeutických a diagnostických postupů. Studium molekulárních mechanismů, které RKB frakci zajišťují kmenové vlastnosti a odolnost k chemo- i radioterapii je nezbytným krokem na cestě k protirakovinným látkám nové generace, které budou schopné eradikovat nádor včetně frakce RKB.

V rámci této práce jsme zavedli kultivaci RKB populace MCF7 buněčné linie. Protokol, který jsme použili, však není omezen na určitou buněčnou linii a v rámci laboratoře (a v rámci jiných projektů) se nám podařilo s jistými úpravami protokolu, vypěstovat RKB i z nádorových linií rakoviny prostaty nebo mesotheliomální rakoviny. Charakterizace expresního profilu dokazuje, že mammosféry vypěstované z MCF7 linie se vyznačují vyšší expresí genů spojených s kmenovostí než parentální populace. Jde zvláště o geny *ABCG-2*, *CD44*, Vimentin a *ERBB2*. Naproti tomu sféry, které jsme vypěstovali z buněk MDA-MB-453 vykazují v rámci sledovaných genů znatelný pokles exprese CD133 a CD44 oproti parentálním MDA-MB-453 a zvýšená exprese genů spojených s kmenovostí není u těchto buněk signifikantní u žádného ze sledovaných genů, kromě *CD24*. Z toho usuzujeme, že tato linie buď klasické mammosféry netvoří, nebo by vyžadovala úpravu podmínek kultivace, což by bylo nad rámec této práce, a to zejména z hlediska časových možností.

Jedním z genů, který v mammosférách vyšel vysoce signifikantně zvýšený ($p < 0,01$) oproti parentálním MCF7 buňkám je i gen pro erbB-2. Tento onkogen je spojován s horší prognózou rakoviny prsu a v nedávné době byla odhalena jeho schopnost zvyšovat procento RKB v populaci a spouštět signální dráhy vedoucí ke zvýšené tumorigenitě a metastatickému potenciálu buněk (Freudenberg et al, 2009; Korkaya et al, 2008). Funkci tohoto genu v kontextu RKB rakoviny prsu jsme v této studii sledovali pomocí snížení exprese erbB-2 stabilní transfekcí MCF7 buněk shRNA plazmidem pro lidský erbB-2. ErbB-2-deficientní linie MCF7 buněk vykazovala

schopnost vytvářet mammosféry, vzhledově neodlišitelné od mammosfér z MCF7 buněk. Z toho usuzujeme, že pro vlastní tvorbu mammosfér není exprese erbB-2 nezbytná. Exprese genů u této erbB-2-deficientní linie se však značně odlišuje od exprese genů u parentálních buněk MCF7, což ukazuje na změny v regulaci signálních drah spojených s erbB-2. Tyto buňky mají signifikantně sníženou expresi ABCG-2 oproti parentálním MCF7 buňkám. Dále je oproti MCF7 buňkám vysoce signifikantně snížena hladina CD47. Naopak hladiny exprese markerů kmenovosti Oct-4, Sox-2, Vimentinu a CD44 jsou signifikantně zvýšeny. Z tohoto expresního profilu však v této fázi nemůžeme odvodit, jak byly změněny vlastnosti těchto buněk spojené s tumorigenicitou. Bude zajímavé zjistit, jak se exprese těchto genů změní v mammosférách vypěstovaných z této linie. Tyto pokusy plánujeme jako další z kroků studia role erbB-2 v biologii RKB.

Pro studium role erbB-2 *in vivo* jsme linii erbB-2-deficientních buněk vpravili do čtyř BALB/c *nu-nu* myší a v současné době sledujeme schopnost těchto buněk iniciovat tvorbu nádoru v porovnání s kontrolními MCF7 buňkami nesoucími NS shRNA plazmid. Myši nesou vždy kontrolní i erbB-2-deficientní buňky MCF7, a to tak, že nad pravým stehenním svalem mají podkožně vpraveny kontrolní buňky, nad levým erbB-2-deficientní buňky. Po třech týdnech od vpichu je zatím hmatatelný pouze jeden nádor. Jde o nádor z linie erbB-2-deficientních buněk, kontrolní buňky u této myši zatím žádný nádor nevytvořily. V těchto výsledků zatím nemůžeme vyvodit žádné platné závěry, kromě konstatování, že v současné fázi se zdá, že erbB-2-deficientní nádorové buňky rostou rychleji než buňky MCF7 s kontrolním NS shRNA plazmidem. Tomu odpovídá i zjištěná vyšší rychlost proliferace, kterou jsme u těchto buněk pozorovali. Pokud toto poměrně nečekané zjištění zůstane platným i po dokončení pokusu, bude nutné jej potvrdit dostatečným počtem opakování experimentu.

Závěrem lze tedy říci, že přesné mechanismy vlivu exprese onkogenu erbB-2 v RKB zůstávají i nadále nejasné. K odhalení mechanismů, kterými buňka získává kmenové vlastnosti v rámci nádoru, by však mohly přispět právě metody kultivace RKB v podobě mammosfér a funkční studie v experimentálních myších tak, jak jsme je zahájili a jak plánujeme jejich pokračování.

V návaznosti na tuto práci plánujeme pokračování experimentů s vnášením xenograftů erbB-2-deficientní linie do nahé BALB/c *nu-nu* myši: po vyhodnocení pokusů s parentální linií MCF7 buněk se sníženou hladinou erbB-2 provedeme obdobný experiment s mammosférami vytvořenými z této linie. U vznikajících nádorů budeme také sledovat míru neoangiogeneze, jejíž sledování přístroj Vevo770 umožňuje, a která také může být do jisté míry ovlivněna hladinou exprese onkogenu erbB-2.

V blízké době plánujeme zavedení myšího syngenního modelu rakoviny prsu. Jedná se o transgenní model FVB/N *c-neu* myši, který nese neaktivní *neu* onkogen (myší homolog erbB-2) pod transkripční kontrolou virového promotoru MMTV. Na rozdíl od transgenních modelů nesoucích aktivovaný *neu* se zde nádory prsního epitelu vytváří až po relativně dlouhé době (regulováno estrogenem) a část z nich po několika měsících růstu metastazuje do plic. Tyto nádory vykazují zvýšenou hladinu mRNA i proteinu erbB-2 a zvýšenou aktivitu *neu*-asociovaných tyrozinových kináz (Guy et al, 1992). Tento model umožňuje studium erbB-2 onkogenu v prostředí funkčního imunitního systému. Experimenty v tomto prostředí tedy jsou výrazně relevantnější než xenografty v imunosuprimovaných myších modelech, neboť v transgenních modelech se nádor vytváří v kontextu normální protinádorové imunity.

Dlouhodobým cílem studia onkogenu erbB-2 je pak snaha o nalezení nových léčiv, účinných i na nádory rezistentní vůči současné terapii. Takovými terapeutiky by mohly být nové látky ze skupiny tzv. mitokanů, destabilizujících mitochondrie nádorových buněk. Díky bioenergetickým rozdílům mezi buňkou transformovanou a normální je možné akumulovat látku v nádorových buňkách ve vyšší koncentraci než v normálních buňkách a účinek takových léčiv je proto selektivní (Neuzil et al, 2007). Zároveň se zdá, že některé z těchto látek jsou velmi potentními induktory apoptózy rakovinných kmenových buněk (Neuzil et al, nepublikováno). Léčba takovými látkami by mohla vést k úplnému vyléčení pacienta bez rizika relapsu onemocnění. Tímto směrem se také bude ubírat můj výzkum role erbB-2 v biologii rakovinných kmenových buněk v navazujícím postgraduálním studiu.

8. Použitá literatura

Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC *et al* (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 439: 599-603.

Ahrens T, Sleeman JP, Schempp CM, Howells N, Hofmann M, Ponta H *et al* (2001). Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* 20: 3399-3408.

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P *et al* (1998). CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J* 12: 1241-1251.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988.

Alvarado D, Klein DE, Lemmon MA (2009). ErbB2 resembles an autoinhibited invertebrate epidermal growth factor receptor. *Nature* 461: 287-291.

Arrington AK, Davydova J, Vickers SM, Yamamoto M (2009). Anti-ERBB2 sh-RNA suppress both cell growth and tumor growth in ERBB2-overexpressing upper gastrointestinal adenocarcinomas. *J Gastrointest Surg* 13: 1754-1761.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140.

Babic I, Schallhorn A, Lindberg FP, Jirik FR (2000). SHPS-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47. *J Immunol* 164: 3652-3658.

Baker R, Kent CV, Silbermann RA, Hassell JA, Young LJ, Howe LR (2010). Pea3 transcription factors and wnt1-induced mouse mammary neoplasia. *PLoS One* 5: e8854.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB *et al* (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.

Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D *et al* (2010). Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 28: 1138-1144.

Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T *et al* (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 65: 10783-10793.

Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X *et al* (1997). HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 15: 1513-1525.

Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737.

Bosher JM, Williams T, Hurst HC (1995). The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 744-747.

Bourguignon LY, Zhu H, Zhou B, Diedrich F, Singleton PA, Hung MC (2001). Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 276: 48679-48692.

Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B (2002). Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 277: 39703-39712.

Brennan KR, Brown AM (2004). Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 119-131.

Brown EJ, Frazier WA (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11: 130-135.

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14: 911-915.

Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C *et al* (2008). Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 122: 298-304.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL *et al* (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344.

Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H, Potten CS (2005). A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol* 277: 443-456.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951.

Collins D, Hill AD, Young L (2009). Lapatinib: a competitor or companion to trastuzumab? *Cancer Treat Rev* 35: 574-581.

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM *et al* (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275: 5512-5520.

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R *et al* (2006). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 24: 975-985.

Curran MP (2010). Lapatinib: in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs* 70: 1411-1422.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW *et al* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10158-10163.

Dey D, Saxena M, Paranjape AN, Krishnan V, Giraddi R, Kumar MV *et al* (2009). Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One* 4: e5329.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ *et al* (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17: 1253-1270.

Dutsch-Wicherek M (2010). RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am J Reprod Immunol* 63: 181-188.

Elsaba TM, Martinez-Pomares L, Robins AR, Crook S, Seth R, Jackson D *et al* (2010). The stem cell marker CD133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer. *PLoS One* 5: e10714.

Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG *et al* (2007). Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. *J Natl Cancer Inst* 99: 616-627.

Freudenberg JA, Wang Q, Katsumata M, Drebin J, Nagatomo I, Greene MI (2009). The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp Mol Pathol* 87: 1-11.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO *et al* (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11: 495-505.

Gianni L, Llado A, Bianchi G, Cortes J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Cameron DA *et al* (2010). Open-label, phase II, multicenter, randomized study of the efficacy and safety of two dose levels of Pertuzumab, a human epidermal growth factor receptor 2 dimerization inhibitor, in patients with human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 28: 1131-1137.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M *et al* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1: 555-567.

Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L *et al* (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10: R52.

Guglin M, Hartlage G, Reynolds C, Chen R, Patel V (2009). Trastuzumab-induced cardiomyopathy: not as benign as it looks? A retrospective study. *J Card Fail* 15: 651-657.

Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10578-10582.

Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-463.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U *et al* (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14228-14233.

Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8933-8938.

Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K *et al* (2008). The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 10: R53.

Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez WY, Robey RW, van de Laar A *et al* (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 61: 6635-6639.

Huang LR, Hsu HC (1995). Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 55: 4717-4721.

Huang M, Li Y, Wu G, Zhang F (2010a). Whole genome expression profiling reveals a significant role for the cell junction and apoptosis pathways in breast cancer stem cells. *Mol Biotechnol* 45: 39-48.

Huang M, Li Y, Zhang H, Nan F (2010b). Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24- cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 80.

Hynes NE, Lane HA (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5: 341-354.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P *et al* (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69: 1302-1313.

Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL *et al* (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* 21: 1423-1430.

Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ *et al* (2006). Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11707-11712.

Jaehne J, Urmacher C, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Cordon-Cardo C, Meyer HJ (1992). Expression of Her2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 118: 474-479.

Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R *et al* (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138: 271-285.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010). Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*.

- Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H (2010). Breast cancer stem cells. *Breast Cancer* 17: 80-85.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW *et al* (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563.
- Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317: 337.
- Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS (2008). HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 27: 6120-6130.
- Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J *et al* (2009). Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 7: e1000121.
- Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C *et al* (2003). CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 4906-4913.
- Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC *et al* (2009). Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res* 69: 5648-5655.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V *et al* (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037.
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF *et al* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100: 672-679.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD *et al* (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 2011-2021.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR *et al* (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5: 67.
- Lou H, Dean M (2007). Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 26: 1357-1360.
- Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P *et al* (2009). Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res* 15: 2010-2021.
- Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S *et al* (2008). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* 112: 2088-2100.
- Mao Q, Unadkat JD (2005). Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 7: E118-133.

- Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, Draper JS, Bahrami AR, Morton I *et al* (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22: 659-668.
- Moasser MM (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26: 6469-6487.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME *et al* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.
- Myers E, Hill AD, Kelly G, McDermott EW, O'Higgins NJ, Young LS (2006). A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression. *Br J Cancer* 95: 1404-1409.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA *et al* (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6: 117-127.
- Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ (2007). Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther* 6: 667-674.
- Nakanishi T, Chumsri S, Khakpour N, Brodie AH, Leyland-Jones B, Hamburger AW *et al* (2010). Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br J Cancer* 102: 815-826.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71: 241-319.
- Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV (2008). Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 18: 260-267.
- Neuzil J, Tomasetti M, Zhao Y, Dong LF, Birringer M, Wang XF *et al* (2007). Vitamin E analogs, a novel group of "mitocans," as anticancer agents: the importance of being redox-silent. *Mol Pharmacol* 71: 1185-1199.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T *et al* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10: 515-527.
- Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288: 2051-2054.
- Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufi S, Del Barco S, Lopez-Bonet E *et al* (2010). Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos)CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun* 397: 27-33.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R *et al* (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-348.
- Orimo A, Weinberg RA (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5: 1597-1601.

- Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E (2006). HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 48: 702-707.
- Park SS, Kim SW (2007). Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. *Oncol Rep* 18: 139-143.
- Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S *et al* (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 140: 62-73.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M *et al* (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958.
- Pellikainen JM, Kosma VM (2007). Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer* 120: 2061-2067.
- Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20: 1287-1299.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D *et al* (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65: 5506-5511.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
- Reynolds BA, Weiss S (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175: 1-13.
- Reynolds BA, Rietze RL (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods* 2: 333-336.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C *et al* (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115.
- Rietze RL, Reynolds BA (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 419: 3-23.
- Sell S (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 1-28.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D *et al* (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 138: 592-603.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J *et al* (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11: 259-273.
- Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S (2005). AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 715-719.

- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T *et al* (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118: 2111-2120.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T *et al* (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE *et al* (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-1416.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104.
- Stefano AB, Iovino F, Lombardo Y, Eterno V, Hoger T, Dieli F *et al* (2010). Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *J Cell Physiol*.
- Stove C, Bracke M (2004). Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis* 21: 665-684.
- Stuelten CH, Busch JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E *et al* (2010). Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS One* 5: e9832.
- Tang C, Ang BT, Pervaiz S (2007). Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 21: 3777-3785.
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S *et al* (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16: 5276-5287.
- Vermeij J, Teugels E, Bourgain C, Xiangming J, in 't Veld P, Ghislain V *et al* (2008). Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 8: 3.
- Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T *et al* (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 12: 468-476.
- Visvader JE, Lindeman GJ (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8: 755-768.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L *et al* (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726.
- Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Lin CY (2010). Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer*.

- Wang N, Stamenovic D (2002). Mechanics of vimentin intermediate filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 535-540.
- Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S *et al* (2006). HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* 10: 25-38.
- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19: 387-393.
- Whiteside TL (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27: 5904-5912.
- Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, Yuan D, Hassell A, Dickerson SH *et al* (2004). A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64: 6652-6659.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM (2007). WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 618-623.
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L (2008). Brcal breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res* 10: R10.
- Xing X, Wang SC, Xia W, Zou Y, Shao R, Kwong KY *et al* (2000). The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* 6: 189-195.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG *et al* (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012.
- Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J (2002). AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 277: 20711-20716.
- Zhou J, Zhang H, Gu P, Margolick JB, Yin D, Zhang Y (2009). Cancer stem/progenitor cell active compound 8-quinolinol in combination with paclitaxel achieves an improved cure of breast cancer in the mouse model. *Breast Cancer Res Treat* 115: 269-277.
- Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z *et al* (2010). The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat* 122: 795-801.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ *et al* (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7: 1028-1034.
- Zobalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J (2008). CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 567-571.

Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W *et al* (2007). FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* 129: 1275-1286.